ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL

DE LA

RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES

DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION DES PRODUITS AGRICOLES

Année 1960

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

OBSERVATIONS SUR LES QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES DU LAIT

PAR

S. KUZDZAL-SAVOIE et G. MOCQUOT

Station centrale de Recherches laitières
et de Technologie des produits animaux
Jouy-en-Josas

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction

PREMIÈRE PARTIE

TRAVAUX ANTÉRIEURS

A. — Apparition des défauts de goût dans le lait.

B. — Conditions de l'examen organoleptique.

C. — Nomenclature des défauts de goût.

D. — Raisons invoquées pour expliquer l'apparition des différents défauts de goût dans le lait.

E. — Influences exercées par divers facteurs sur l'apparition des défauts de goût dans le lait.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

A. — Méthode expérimentale.

B. — Résultats.

Discussion et conclusion.

INTRODUCTION

Dans les pays où la consommation du lait en nature est très répandue, en particulier dans les pays scandinaves et anglo-saxons, on attache une grande importance à la qualité organoleptique du lait. Celui-ci est consommé très souvent froid, ce qui est certainement la manière de beaucoup la plus agréable de savourer du lait de bonne qualité, mais ce qui permet aussi au connaisseur de déceler la présence éventuelle de certains défauts que le consommateur de lait chaud ou bouilli ne perçoit pas ou perçoit moins. D'autre part, dans les pays scandinaves et anglo-saxons, la pasteurisation à laquelle le lait est soumis avant d'être livré à la consommation ne modifie que très peu le goût et l'odeur naturels du lait.

En France, l'obtention d'un lait de bonne qualité organoleptique n'a pas été, jusqu'à ces dernières années l'une, des préoccupations essentielles des producteurs et industriels laitiers. La consommation de lait pur est en effet restreinte dans notre pays ; on lui préfère généralement celle de lait additionné de café ou de chocolat, et, dans l'un et l'autre cas, le lait est consommé chaud. D'autre part, la pratique très répandue de l'ébullition domestique — qui s'ajoute à une ou deux pasteurisations industrielles successives — modifie profondément les caractères organoleptiques que le lait possédait à l'origine et il n'y a rien d'étonnant à ce que la France reste un pays relativement faible consommateur de lait en nature, étant donné le caractère peu attractif d'un lait bouilli après deux pasteurisations.

Or, il serait souhaitable de développer en France la consommation du lait en nature. Les nutritionnistes, les économistes et ceux qui se préoccupent d'améliorer la « santé morale » des Français sont d'accord sur ce point. Toutefois, le développement de la consommation du lait en nature suppose que ce lait possède des caractéristiques qui lui confèrent la qualité d'un aliment « désiré » par le consommateur. Il est certain qu'un grand progrès dans ce sens serait accompli si l'ébullition domestique n'était plus pratiquée que dans les cas limites (1) où elle présente un avantage particulier (alimentation des nourrissons) et si la pasteurisation du lait destiné aux grandes villes était effectuée dans des conditions normales c'est-à-dire une seule fois (et non pas deux), à une température convenable.

Le problème de l'augmentation de la consommation du lait en France, serait donc un problème d'ordre psychologique et technologique s'il n'était apparu au cours des dernières dizaines d'années certains défauts dans le goût et l'odeur du lait cependant récolté, traité et distribué dans

de bonnes conditions. Diverses raisons ont été invoquées pour expliquer ce phénomène :

— l'amélioration de la qualité bactériologique du lait à la récolte et l'emploi des procédés modernes de traitement et de transport, permettent d'augmenter le délai séparant le moment de la production du lait de celui de sa consommation ;

— certaines modifications dans les méthodes d'alimentation du bétail concernant en particulier l'introduction de procédés de conservation des aliments (ensilage) ou les changements dans la nature des aliments le plus souvent utilisés (moins d'herbe et davantage de betteraves et de sous-produits de sucrerie, de distillerie ou de brasserie).

De très nombreuses publications se rapportent à l'étude des différents défauts de goût rencontrés dans le lait. Nous n'en retiendrons que quelques-unes dans cette introduction. HERRINGTON (2) expose l'état actuel de nos connaissances sur la rancidité du lait. BROWN et THURSTON (3), GREENBANK (4), KRUISHEER (5), LEA (6) et RIEL et SOMMER (7) résument les travaux des auteurs concernant la saveur oxydée. Le défaut de goût qui se développe dans le lait à la suite de l'exposition à la lumière est étudié par STULL (8) ; PATTON (9) expose les travaux concernant les goûts de cuit et de caramel et le brunissement du lait.

Les avis émis par les très nombreux auteurs qui se sont intéressés au problème des défauts de goût dans le lait, s'ils ne sont pas contradictoires, sont souvent différents.

L'utilisation des techniques modernes de séparation et d'identification de substances présentes en très petites quantités a cependant permis, ces dernières années d'obtenir des résultats précis concernant les éléments responsables de l'apparition de certains défauts de goût ; l'utilisation de la technique de chromatographie en phase gazeuse paraît à cet égard pleine de promesses.

Etant donné l'importance des travaux étrangers consacrés à l'examen organoleptique du lait et la nécessité d'employer un vocabulaire aussi précis que possible dans un domaine particulièrement délicat, il a semblé nécessaire avant de passer à l'examen des observations que nous avons faites à Jouy-en-Josas au cours des dernières années, de donner un aperçu assez large des conclusions principales auxquelles ont abouti les chercheurs qui se sont préoccupés de ces questions.

PREMIÈRE PARTIE

TRAVAUX ANTÉRIEURS

A. — APPARITION DES DÉFAUTS DE GOUT DANS LE LAIT

L'apparition des défauts de goût dans le lait ne constitue pas un fait exceptionnel ; c'est au contraire un phénomène fréquent. Dans la mesure où des observations portant sur un grand nombre d'échantillons de lait ont pu être rassemblées, on constate qu'un pourcentage élevé des laits examinés présente un défaut de goût.

Ainsi ROLAND, SORENSEN et WHITAKER (10) montrent que 21 p. 100 des échantillons de lait commercial examinés pendant l'hiver 1935-1936 présentaient une saveur oxydée. ROADHOUSE et HENDERSON (11) rapportent qu'au cours d'une période de cinq années (1930-1934), sur 349 échantillons de lait de mélange examinés, dont les deux tiers étaient des laits crus, 42,3 p. 100 présentaient un défaut de goût ou d'odeur.

B. — CONDITIONS DE L'EXAMEN ORGANOLEPTIQUE

Les examens organoleptiques dont les résultats ont été rassemblés par différents auteurs ont porté sur des échantillons de laits commerciaux (10, 12, 13, 14, 15), sur des échantillons de laits individuels provenant de divers animaux d'un troupeau expérimental (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) ou sur des échantillons de lait de mélange (lait produit par l'ensemble d'un troupeau (23, 25, 26)). Le lait examiné était cru ou pasteurisé. Il pouvait en outre avoir été soumis à divers traitements favorisant l'apparition de certains défauts de goût : contact avec certains métaux surtout le cuivre (27, 28, 29), exposition aux radiations solaires (12, 13, 19, 29), agitation (30, 31), homogénéisation (30, 32), changements de température (33).

Malgré la diversité des échantillons de lait soumis à l'examen organoleptique, les conditions mêmes de cet examen sont très semblables d'une expérience à l'autre. Après prélèvement — et éventuellement traitement par l'un des procédés exposés ci-dessus —, les échantillons sont placés en chambre froide à 2°C et examinés après 24 heures (27), plus souvent 48 heures (15 *b*) et quelquefois trois jours (14) de conservation. Il arrive aussi qu'ils soient périodiquement examinés au cours d'un séjour plus prolongé à la glacière (4°5C) (34).

Le lait est généralement réchauffé à 35°C au moment de l'examen organoleptique.

Le maintien des échantillons au froid permet de les examiner après un délai correspondant à celui qui sépare normalement la production du lait de sa consommation, sans qu'une altération microbienne banale (acidification) puisse se produire. On a observé que certains goûts non apparents dans le lait immédiatement après la traite deviennent apparents après un certain temps : il en est ainsi pour le goût de rance ; de même la saveur oxydée se développe ou s'accentue au cours du vieillissement à basse température (4). Toutefois la saveur oxydée provoquée par l'exposition à la lumière solaire apparaît immédiatement (11).

C. — NOMENCLATURE DES DÉFAUTS DE GOUT

On retrouve les mêmes défauts de goût dans les laits individuels et dans les laits de mélange, qu'il s'agisse d'un développement spontané ou provoqué.

Lors de l'examen organoleptique du lait, les organes du goût et ceux de l'odorat sont également affectés. Les défauts peuvent donc provenir d'une saveur ou d'une odeur anormales du lait. De plus il arrive souvent dans le langage courant que le terme de goût soit utilisé pour définir une odeur (goût de pourri ou de moisi).

L'étude des laits individuels montre qu'il existe une graduation du goût et de l'arôme des laits « sans défaut » allant d'un lait fade ou plat à un lait excellent et parfumé.

Le défaut de goût le plus connu des éleveurs est certainement le goût qui provient de la nourriture du bétail : goût de choux, de navet, de pulpe, de foin fermenté et surtout d'ensilage ; ce dernier défaut est particulièrement accentué lorsqu'un ensilage de mauvaise qualité est distribué aux vaches laitières.

Nous citerons ensuite les défauts provoqués par une modification chimique des constituants du lait. Le plus simple à définir est le goût de rance qui rappelle le plus souvent l'odeur et le goût de l'acide butyrique et qui se caractérise parfois par une odeur de chèvre ou un goût de savon.

Les auteurs anglo-saxons groupent sous le terme général d' « oxydized flavor », que nous proposons de traduire — faute de mieux — par « saveur oxydée », les défauts de goût suivants : graisseux (*oily*), suiffeux (*tallowy*), goût de papier, de carton (*cardboard*), goût métallique, goût de capsule en carton (*cappy*), de lumière solaire, de « soleil » (*sunlight* ou *sunshine* ou *solar activated flavor*), de brûlé (*burnt flavor*), etc. Or il est certain que ces différents termes caractérisent chacun une saveur particulière au lait : l'oxydation de la matière grasse du lait peut provoquer l'apparition des goûts graisseux ou suiffeux, mais pas forcément celle des goûts de papier ou de carton.

NELSON et TROUT (15) proposent de prendre comme « étalon », pour la saveur oxydée, le goût qui se développe dans le lait d'hiver additionné de 0,5 mg de sulfate de cuivre par litre, après un séjour de 48 heures à 2°C. Mais ce n'est malheureusement pas ainsi qu'ont procédé tous les auteurs qui ont étudié la saveur oxydée du lait.

Les divers traitements thermiques, auxquels peut être soumis le lait, provoquent l'apparition des goûts de cuit, de brûlé, ou de caramel qui proviennent également d'une modification chimique de certains constituants du lait.

D. — RAISONS INVOQUÉES POUR EXPLIQUER L'APPARITION DES DIFFÉRENTS DÉFAUTS DE GOUT DANS LE LAIT

I. — Goût provenant de la nourriture.

Un tel goût existe dans le lait dès la traite, et particulièrement lorsque la nourriture est distribuée aux vaches laitières peu de temps avant la traite (15) ou pendant la traite (25). ROADHOUSE et KOESTLER (35) estiment que l'influence de la nourriture est éliminée si l'on empêche toute distribution d'aliments pendant les cinq heures qui précèdent la traite. ROADHOUSE et HENDERSON (11) ont confirmé ce point et ont précisé que si l'on distribue de la luzerne en vert le goût de nourriture apparaît dans le lait une heure à deux heures après la consommation du fourrage, alors que du « jus » de luzerne distribué en breuvage, provoque l'apparition du défaut de goût 20 minutes après l'absorption, l'intensité du défaut étant maximum après 45 à 60 minutes. Ces auteurs estiment cependant que la transmission du goût du lait se fait par l'intermédiaire des systèmes digestif et circulatoire, conclusion à laquelle aboutit également KAGI (25) qui constate que, même distribué après la traite, l'ensilage provoque l'apparition d'un défaut de goût dans le lait de la traite suivante. Cet effet nocif est d'autant plus accentué que l'ensilage est de moins bonne qualité. Il est possible que l'ensilage de mauvaise qualité renferme des substances susceptibles de passer dans le lait tandis que l'ensilage de bonne qualité ne contient pas ces substances. L'idée a été émise que l'absorption des odeurs pourrait se faire par les voies respiratoires de la vache (36 *a*).

Les sous-produits de l'industrie betteravière (pulpe, pulpe ensilée) plutôt que les betteraves elles-mêmes ont été souvent rendus responsables d'un défaut de goût général du lait dans les régions où ils sont abondamment distribués aux vaches laitières. Le remplacement des résidus de sucrerie par du foin redonne un lait normal (37).

II. — Goût de rance.

Comme le propose HERRINGTON (2) nous appellerons goût de rance, le goût qui se développe dans le lait par suite d'une hydrolyse de la matière grasse donnant naissance à des mono- et diglycérides (38), à des acides gras libres et éventuellement à de la glycérine libre, sous l'action de la lipase. Les défauts de goût provenant d'une oxydation de la matière grasse ne rentrent pas dans cette catégorie et seront étudiés dans le paragraphe suivant.

Les auteurs ont mis en évidence l'altération chimique de la matière grasse, corrélative de l'apparition du goût de rance, par diverses méthodes: mesure de l'acidité libre (39), mesure de la tension superficielle (celle-ci diminue en présence d'acides gras libres) (20, 40), distillation, séparation et identification par chromatographie (36 *b*) des acides gras libres et volatils.

Les différents goûts de « rance » signalés peuvent s'expliquer par la nature et les proportions variables des acides gras libérés. On observe que les goûts de rance sont fréquemment alliés à des goûts d'amertume (2, 41, 42, 43) et l'on pense généralement que les mono-ou diglycérides sont à l'origine de ces goûts amers (2). HLINKA et HOOD (44) montrent qu'une activité lipasique est à l'origine du développement du goût de rance dans le fromage de Cheddar fabriqué à partir du lait cru.

La lipase existerait dans tous les laits mais elle est généralement considérée comme inactive dans la mamelle (2). Cependant un récent travail de THOMAS, HARPER et GOULD (22) semble contredire ce dernier point. Ces auteurs ont en effet montré qu'une certaine activité lipasique pouvait exister dans la mamelle puisque l'on trouve dans les premières portions de lait trait une quantité d'acides libres supérieure à celle trouvée dans les portions suivantes. KELLY (45) a de plus montré que le tissu de la glande mammaire contenait des enzymes capables d'hydrolyser les graisses neutres du sang et de recombiner les acides gras libres lors de leur passage à travers le tissu cellulaire secrétoire.

Quoiqu'il en soit, la lipase peut devenir active dans le lait : soit spontanément sous l'effet d'un simple refroidissement, soit à la faveur de certaines conditions telles que : variations déterminées de température (33), agitation (31) ou homogénéisation (2, 32). La vitesse de refroidissement peut intervenir : KRUKOWSKY et HERRINGTON (46) précisent que si le lait est refroidi en quelques secondes, la lipolyse est notablement réduite au cours de l'entreposage ultérieur.

Il est de plus intéressant de noter que le cycle de température qui produit l'activation de la lipase est le même que celui utilisé pour augmenter la consistance de la crème (2).

Le rôle joué par la membrane des globules gras au cours de l'activa-

tion de la lipase est certainement important. En ce qui concerne les laits dans lesquels le goût de rance se développe spontanément à la suite d'un simple refroidissement, TARASSUK et JACK (47) pensent qu'au cours d'un tel refroidissement, la lipase est irréversiblement adsorbée sur les globules gras et la lipolyse commence immédiatement après l'adsorption. HERRINGTON (32) estime que la lipolyse est simplement plus rapide à basse température, phénomène qui ne peut être expliqué par l'adsorption seule. THOMAS et al. (22) ont montré que les laits présentant la plus forte activité lipasique contenaient les plus petits globules gras ; cette observation concorde avec le fait que l'homogénéisation, qui favorise l'action de la lipase, réduit la taille moyenne des globules gras et multiplie leur nombre.

HERRINGTON (2) insiste sur l'importance du rôle de la mousse lors de l'activation de la lipase par l'agitation, ce que TARASSUK et FRANKEL (48) confirment.

Il est courant d'écrire que l'acidité inactive la lipase (2). Une série de travaux appuie cette opinion.

ROHAN et SOMMER (49) mesurant l'activité lipasique de la crème saturée de sucre, trouvent un pH optima de 8,4-8,6. GOULD (50) définit une zone de pH optimum entre 8,0 et 9,0 lors de l'hydrolyse de la matière grasse homogénéisée dans le sérum obtenu après action de la présure sur du lait cru. MATTICK et KAY (51), utilisant comme substrat de la tributyrine trouvent un pH optimum de 8,2 à 8,7. Ceci est confirmé par PETERSON et al. (52) (pH optimum 8,5) mais ces auteurs trouvent en outre une activité lipasique faible entre les pH de 5,0 et 5,5. ALBRECHT et JAYNES (53) confirment l'existence d'une activité lipasique entre pH 5,0 et 6,6 et déterminent deux pH optimum 5,4 et 6,3.

Il semble donc admis que l'activité lipasique du lait n'est pas due à une substance unique. En fait HERRINGTON et KRUKOWSKI (42) supposent l'existence d'au moins deux enzymes, ce que confirment PETERSON et al. (52), ROHAN et SOMMER (49). D'autre part, il a été établi que la lipase du lait peut hydrolyser des graisses variées (50) et des esters d'acides gras (49, 52, 54, 55). Les travaux récents de SCHWARTZ, GOULD et HARPER (56) confirment l'existence dans le lait d'un système lipasique multiple.

III. — Saveur oxydée.

a) Nature.

D'après NELSON et TROUT (15) la saveur oxydée est caractérisée par une réaction rapide des organes du goût, la sensation étant perçue dès que le lait est porté à la bouche. Cette sensation métallique se transforme en même temps que se développe la saveur oxydée ; d'après ces

auteurs la sensation s'identifierait ensuite au goût de papier, pour se rapprocher enfin du goût huileux ou suiffeux.

Au cours de travaux récents, les auteurs insistent cependant sur la distinction qu'il convient de faire entre l'apparition de la saveur oxydée dans le lait entier et dans le lait écrémé. Le goût métallique ou de papier qui se développe dans le lait écrémé additionné de cuivre serait différent de la saveur oxydée proprement dite, telle qu'elle apparaît dans le lait entier (57, 58). Cependant les termes de goût « métallique » ou de « papier » ont bien été utilisés pour définir la saveur oxydée.

PONT (58) résume ainsi ce point : la saveur oxydée induite par le cuivre dans le lait entier est constituée par deux éléments de goût distincts ; l'un est un goût huileux et métallique dû à l'oxydation de la graisse, l'autre est un goût de « carton » provenant d'une réaction ou d'une série de réactions qui se produisent aussi bien dans le lait entier que dans le lait écrémé.

b) **Isolement de substances responsables de la saveur oxydée.**

KEENEY et DOAN (59) trouvèrent en 1951 que les composés odorants prédominants dans la fraction volatile neutre obtenue à partir de la matière grasse de lait oxydée étaient des cétones : aucune méthylcétone mais une grande proportion de cétones insaturées.

HOLM, WODE et THOMÉ (60) et THOMÉ et MATTSSON (61) ont montré que les substances responsables du goût huileux du beurre étaient des produits provenant de l'oxydation et de la dégradation des acides gras insaturés ; en outre l'apparition du défaut du goût est liée non seulement à la formation de peroxydes mais aussi à la dégradation de ces peroxydes en aldéhydes et cétones.

FORSS, PONT et STARK (62, 63), au cours de travaux récents, distillèrent du lait écrémé présentant une saveur oxydée. Ils isolèrent et identifièrent par chromatographie des composés volatils dont les plus abondants furent les aldéhydes 2 octenal, 2 nonenal, 2-4 heptadienal et 2-4 nonadiénal. Ces composés ajoutés au lait écrémé aux dilutions 10^{-7} à 10^{-9} lui communiquent un goût très semblable au goût de « carton ».

c) **Origine de la saveur oxydée.**

De très nombreuses hypothèses ont été formulées pour expliquer l'origine de la saveur oxydée du lait. Même lorsque ces hypothèses ont été émises à la suite d'expériences parfaitement conduites, il est possible qu'une trop rapide généralisation, à partir des résultats obtenus au cours de l'étude d'un seul aspect du problème, conduise à une interprétation erronée.

Nous indiquerons sommairement les principales hypothèses sans pouvoir présenter la totalité des travaux qui les appuient.

1. Influence du taux butyreux : une étude (10) poursuivie pendant l'hiver 1935-1936 sur 139 échantillons de lait pasteurisé provenant de 19 localités a montré que le taux butyreux des laits, dans lesquels se développait la saveur oxydée était généralement plus élevé que celui des laits ne présentant pas ce défaut.

2. Influence de la nature de la matière grasse : Kende (64) et Dahle et Palmer (65) ont observé que l'indice d'iode de la matière grasse des échantillons de lait dans lesquels se développe spontanément la saveur oxydée est plus bas que l'indice d'iode des échantillons de contrôle. Ces auteurs pensent que le développement de cette saveur serait parallèle à une oxydation de la matière grasse elle-même.

Cette observation n'a cependant pas été confirmée. Brown, Dustman et Thurston (66) ne trouvent pas de changements appréciables de l'indice d'iode de la matière grasse d'échantillons de lait qui présentent une saveur oxydée plus ou moins prononcée. Le travail de Henderson et Roadhouse (67) montre que ce défaut se développe dans le lait additionné de cuivre alors qu'une fraction seulement de la période d'induction de la matière grasse s'est écoulée. Or Holm et Greenbank (68) ont montré que l'indice d'iode de la matière grasse ne décroissait pas avant la fin de la période d'induction celle-ci étant marquée par une absorption d'oxygène qui augmente rapidement et par une décoloration de la matière grasse (34).

D'après Stebnitz et Sommer (24), la stabilité de la matière grasse du beurre, vis-à-vis de l'oxydation serait en raison inverse de son degré d'insaturation.

3. Rôle des phospholipides : Horrall (69) constate que plus le taux butyreux du lait est élevé, plus riche est le contenu en lécithine. Il trouve aussi que le lait écrémé contient environ la moitié du contenu en lécithine du lait entier et peut présenter une saveur oxydée nette.

Thurston, Brown et Dustman (70) ont de leur côté montré que l'intensité de cette saveur dans la crème, le lait écrémé, le babeurre et le beurre obtenus à partir de lait à saveur oxydée, était en relation directe avec le contenu en phospholipides.

Brown, Dustman et Thurston (66) ont établi que, même si les doubles liaisons de l'acide oléique rentrant dans la constitution de l'oléostéarolécithine du lait étaient complètement oxydées, cela ne serait pas décelable par la simple mesure de l'indice d'iode de la matière grasse ; Swanson et Sommer (71) ont montré que le développement de la saveur oxydée s'accompagnait d'une nette diminution de l'indice d'iode de la fraction phospholipidique ; l'oxydation de cette fraction restant d'ailleurs incomplète. De même Hietaranta (72) attribue le goût huileux à l'oxydation des acides insaturés libérés lors de l'hydrolyse de la lécithine.

Récemment Riel et Sommer (73) ont confirmé le rôle des phospholipides dans le développement de la saveur oxydée. Ces auteurs ont montré qu'au cours de l'oxydation limitée des phospholipides du lait se formaient des composés susceptibles de reproduire la saveur oxydée par addition dans le lait. Cependant Beck, Whitnah et Martin (74), n'ont pas trouvé de relation entre le développement de la saveur oxydée et le contenu en lécithine du lait cru, non plus que Gould, Fox et Trout (75).

Récemment également Pont (58) a établi que le goût de « carton » se développe de la même façon dans le babeurre et dans le lait écrémé même lorsque celui-ci ne contient plus de phospholipides.

4. Rôle de divers traitements subis par le lait : Thurston, Brown et Dustman (30) ont montré que l'homogénéisation, l'agitation à basse température, le refroidissement du lait suivi d'un réchauffement, qui sont tous des facteurs d'activation de la lipase du lait réduisent au contraire l'apparition de la saveur oxydée. Guthrie (76) a également constaté que l'homogénéisation empêche le développement de la saveur oxydée dans le lait commercial.

5. Rôle de substances diverses : L'hypothèse a été émise suivant laquelle le lait résistant à l'oxydation pouvait contenir des substances réductrices (64) ou protectrices (24).

Le rôle possible de l'acide ascorbique, du carotène et du tocophérol a été étudié.

Rôle de l'acide ascorbique : Brown, Thurston et Dustman (77) ont constaté que l'addition d'acide ascorbique pur, de jus de tomate ou de jus de citron, dans la ration des vaches laitières réduisait considérablement le développement de la saveur oxydée dans le lait. Ces auteurs attribuent ce résultat à l'influence de la vitamine C. Brown, Vanlandingham et Weakley (78) confirment cette opinion.

D'autre part, Sharp, Trout et Guthrie (79) trouvent une nette relation entre le taux de disparition de la vitamine C pendant l'entreposage du lait pasteurisé à 143° F (62°C) pendant 30 minutes, et le développement de la saveur oxydée. Beck, Withnah et Martin (80) ne confirment pas ce point de vue en ce qui concerne le lait cru.

Il semble bien acquis cependant qu'une destruction partielle de l'acide ascorbique du lait stimule le développement de la saveur oxydée (14) et qu'une destruction complète et rapide de l'acide ascorbique inhibe au contraire le développement de cette même saveur oxydée ou encore du goût suiffeux du lait (82, 83). Olson et Brown (84) pensent que l'oxydation de l'acide ascorbique entraîne celle des phospholipides et permet ainsi la libération des composés responsables de la saveur oxydée.

L'addition d'acide ascorbique au lait reste cependant, d'après Chil-

SON et al. (83), la seule méthode d'intérêt pratique qui puisse être utilisée pour lutter contre la saveur oxydée du lait commercial.

Rôle du carotène. — BROWN et al. (78) constatent que l'addition de carotène dans la ration des vaches laitières diminue le développement de la saveur oxydée du lait.

Travaillant sur des laits individuels, BECK et al. (80) trouvent que la matière grasse des laits présentant la saveur oxydée est moins colorée que celle des laits sans défaut. Ces auteurs suppriment le développement de la saveur oxydée dans le lait cru en incorporant à la ration journalière d'une vache laitière 206 mg de carotène. De même ANDERSON (85) trouve qu'en ajoutant 5 livres de carottes à la ration journalière d'une vache produisant un lait d'hiver à la saveur oxydée, ce défaut est supprimé.

Ceci nous permet d'introduire la remarque suivante : DAHLE et PALMER (65) avaient constaté une diminution de l'indice d'iode de la matière grasse des laits présentant une saveur oxydée. Indépendamment du fait que la matière grasse avait probablement atteint la fin de la période d'induction avant le moment où l'on avait déterminé l'indice d'iode, les auteurs de ce travail ont signalé que la matière grasse obtenue à partir des laits étudiés était particulièrement peu colorée. NELSON et DAHLE (34) pensent donc que l'existence d'une matière grasse très peu colorée peut être associée à une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'oxydation.

Cependant STEBNITZ et SOMMER (24), travaillant sur des laits individuels, affirment qu'il n'y a pas de relation entre le contenu en carotène, tel qu'il est mis en évidence par la couleur de la matière grasse, et la stabilité du lait vis-à-vis de l'oxydation.

Rôle du tocophérol. — KRUKOWSKY (86) attribue à la présence de tocophérol la résistance plus grande des laits d'été au développement de la saveur oxydée.Cet auteur établit que l'incorporation dans la ration de la vache laitière de 1 à 2 g par jour d'un mélange de tocophérols augmente le contenu en tocophérol de la matière grasse du lait d'hiver en même temps que la résistance du lait à l'oxydation.

Cependant HVIDSTENH, MEHLUM et SIMONSEN (18) n'ont pas pu établir de relation nette entre le contenu en tocophérol du lait et la résistance à l'oxydation.

6. POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION : De même, il ne semble pas qu'une relation nette puisse être établie entre le potentiel d'oxydo-réduction du lait et le développement de la saveur oxydée. WEBB et HILEMAN (87) ont montré que l'addition de cuivre au lait augmente le potentiel d'oxydo-réduction en même temps que se développe la saveur oxydée. Cependant la saveur oxydée ne se développe pas dans les laits

d'été, alors que leur potentiel d'oxydo-réduction est élevé. Ces auteurs constatent de plus que la saveur oxydée se développe dans des laits individuels dont le potentiel d'oxydo-réduction est bas.

7. Rôle des micro-organismes : Il est reconnu que la saveur oxydée est plus fréquente dans le lait à faible teneur en bactéries (Riel et Sommer (7)). Cela serait dû à une plus faible concentration en oxygène, à un abaissement du potentiel d'oxydo-réduction, fait déjà signalé par Greenbank (4). Cependant Webb et Hileman (87) ne pensent pas que la plus grande résistance des laits d'été au développement de la saveur oxydée soit en rapport avec la teneur élevée en germes microbiens.

IV. — Défaut de goût du lait provoqué par l'exposition à la lumière.

Nous avons vu que ce goût particulier n'est le plus souvent considéré que comme un aspect de la saveur oxydée prise dans un sens très large.

Davies (88), Tracy et Ruehe (89) distinguent cependant deux goûts dans le lait exposé à l'action de l'énergie lumineuse. Le premier est la saveur oxydée et suiffeuse bien connue et sur laquelle nous venons de nous étendre plus haut, le second est décrit comme goût « activé » (solar-activated flavor) ou encore désigné comme « sunlight flavor », expression dont l'équivalent français reste à trouver. Stull (8) a présenté, en 1953, une revue des publications parues sur la question du défaut de goût provoqué par l'exposition du lait à la lumière.

Il est bien connu que cette exposition à la lumière détruit la vitamine C (90) ce qui peut en partie expliquer l'apparition de la saveur oxydée. Cependant, Weinstein et Trout (91) ont montré qu'en période de pâturage, dans un tiers des laits individuels, pasteurisés, homogénéisés et exposés au soleil pendant 30 ou 60 minutes, le goût caractéristique ne se développait pas alors que pendant la période de nourriture sèche tous les échantillons se montraient sensibles à ce traitement.

Le développement du goût résiste à l'addition d'acide ascorbique ou de tocophérol ou à un traitement par la chaleur (80°C pendant 5 minutes) mais est inhibé, soit par l'addition d'eau oxygénée, soit au contraire par celle d'un antioxygène (acide nordihydroguaiarétique) (92, 93).

L'homogénéisation retarde également le développement de ce goût particulier d'oxydé (94).

Weinstein et Trout (95) ont isolé des protéines du lactosérum une fraction sensible à la lumière, dans laquelle on peut retrouver le goût typique du lait homogénéisé exposé à la lumière.

Herreid et al. (96) ont observé qu'une exposition prolongée à la lumière entraîne une diminution de l'intensité du goût « activé » ; celui-ci peut même totalement disparaître. Ceci serait dû à une oxydation du ou des composés responsables de ce goût particulier.

En 1954, PATTON (98) a mis en évidence le rôle joué par la riboflavine dans le développement du défaut de goût provoqué par l'exposition du lait à la lumière.

V. — Goût de cuit, de brûlé, de caramel.

Ce goût est particulier au lait pasteurisé ou chauffé. Il est admis que la pasteurisation basse altère très faiblement le goût du lait et même en général augmente la qualité organoleptique de la plupart des laits crus.

Après un chauffage momentané vers 74°C ou un chauffage prolongé pendant une heure à 61°C (103), un goût de cuit distinct commence à se développer.

Ce goût provient des composés sulfhydrilés (97, 99, 100, 103) libérés par la dénaturation de la β-lactoglobuline par la chaleur (97).

On a montré que les groupes SH disparaissent lentement quand le lait est maintenu pendant des périodes prolongées à haute température et que le goût de cuit dans le lait semble alors donner place au goût de caramel (101, 102) en même temps que se produit le brunissement du lait.

Le lactose et la caséine jouent un rôle essentiel dans le brunissement du lait (9) et un certain nombre de modifications chimiques sont associées au brunissement du lait en même temps qu'au développement du goût de caramel. On a observé la formation de composés variés (9) : alcool furfurique, 5-hydroxyméthylfurfural, maltol, acetol, methylglyoxal, acides butyrique, propionique, acétique, formique, lactique et pyruvique, gaz carbonique, hydrogène sulfuré, substances réductrices, substances fluorescentes.

Nous remarquerons cependant que certains de ces composés ont été détectés après application de traitements par la chaleur qui dépassent les traitements auxquels est normalement soumis le lait commercial.

Une certaine concurrence entre le développement du goût de cuit et celui de la saveur oxydée a été notée par NELSON et DAHLE (34) : le goût de cuit apparu dans des laits chauffés à 80°C disparaissait lors de l'entreposage au froid (4°5C) faisant progressivement place à la saveur oxydée. Ces auteurs pensent que les substances réductrices formées au cours du chauffage préviennent le développement de la saveur oxydée ; mais après un long séjour au froid (deux à trois semaines) ces substances sont oxydées et la matière grasse qui s'oxyde à son tour entraîne l'apparition de la saveur oxydée. On sait d'autre part qu'une température suffisamment élevée pour provoquer l'apparition du goût de cuit dans le lait, inhibe largement le développement de la saveur oxydée (104).

Enfin, WEINSTEIN et TROUT (92) ont constaté que le goût de cuit produit par un traitement thermique disparaissait à la suite d'une exposition à la lumière.

E. — INFLUENCES EXERCÉES PAR DIVERS FACTEURS SUR L'APPARITION DES DÉFAUTS DE GOUT DANS LE LAIT

I. — Influence de la saison.

La meilleure qualité organoleptique des laits d'été par rapport aux laits d'hiver est un fait relevé par tous les auteurs. Il serait d'ailleurs plus exact d'écrire que le lait produit par les vaches en pâture est meilleur que le lait produit par les vaches en période de stabulation. L'atmosphère souvent confinée de l'étable, la distribution d'une nourriture dans laquelle n'entre pas d'herbe fraîche, peuvent partiellement expliquer cette constatation.

Les défauts de goût, précédemment décrits s'observent le plus souvent pendant la période de stabulation.

a) Goût de rance.

Nelson et Trout (15) estiment que ce défaut n'apparaît que dans le lait cru, et ne le relèvent généralement que d'octobre à fin mars.

b) Saveur oxydée.

Mattick (105) fut un des premiers à établir l'existence d'une variation saisonnière dans l'apparition de la saveur oxydée. Il indique que cette saveur oxydée du lait peut apparaître pendant l'automne, l'hiver et le printemps mais non pendant l'été. Après lui, un grand nombre d'auteurs ont confirmé ce point.

Nelson et Trout (15) notent l'apparition de ce défaut de novembre à mai et précisent qu'il est particulièrement accentué à la fin de l'hiver (février et mars). Ces auteurs spécifient qu'il s'agit d'un défaut strictement hivernal correspondant à une période d'alimentation sèche.

Beck, Whitnah et Martin (74) insistent sur le fait que cette saveur oxydée apparaît en hiver même lorsque le lait est produit dans les meilleures conditions sanitaires et lorsque toute disposition est prise pour éviter toute contamination métallique et toute exposition à la lumière.

Aule et Storgards (12) montrent que la facilité avec laquelle la saveur oxydée se développe dans le lait sous l'effet d'une exposition à la lumière est nettement plus grande pendant le premier semestre de l'année que pendant le second, mais qu'elle s'élève cependant en novembre et décembre.

En Australie Pont (106) relève que le développement de la saveur oxydée dans le lait exposé à la lumière est peu prononcé en décembre

(début de l'été austral) mais que par contre le développement de la saveur oxydée due à l'addition de 2 parties par million de cuivre dans le lait est très accentué pendant les mois de novembre, décembre et janvier, c'est-à-dire pendant les mois d'été. Nous remarquons qu'en Australie comme en Nouvelle-Zélande l'indice d'iode est alors minimum.

Nous avons étudié plus haut la relation qui existe entre l'apparition de la saveur oxydée dans le lait et le contenu en acide ascorbique du lait. TROUT et JESSIG (14) ont montré que le lait produit en hiver contenait moins d'acide ascorbique que le lait produit pendant le reste de l'année ; le lait produit en été étant le plus riche en acide ascorbique.De semblables variations saisonnières existent pour le contenu en carotène (107, 108, 109) ou en tocophérol (16) du lait, substances auxquelles certains auteurs ont attribué un rôle protecteur vis-à-vis du développement de la saveur oxydée. La diminution de ces substances dans les laits d'hiver serait donc susceptible de favoriser l'apparition de la saveur oxydée.

c) Goût provenant de la nourriture.

L'apparition de ce défaut est fonction de la nature de l'alimentation distribuée aux vaches laitières. NELSON et TROUT (15) relèvent le goût d'ensilage vers la fin de l'hiver et pensent qu'à une mauvaise ventilation de l'étable s'ajoute à cette époque l'odeur forte que dégage l'ensilage.

2. — Influence de la pasteurisation.

NELSON et TROUT (15) notent que la saveur oxydée apparaît principalement dans les échantillons de lait pasteurisés. C'est également l'avis de ROADHOUSE et HENDERSON (11) qui précisent que cette saveur et le goût de cuit sont les principaux défauts relevés sur les échantillons de lait pasteurisé.

3. — Influence de la race.

a) Goût de rance.

BECK, WHITNAH et MARTIN (74) remarquent que le lait produit par un groupe de vaches Jerseyaise et Guerneseyaise devient plus fréquemment rance que le lait produit par des vaches Frisonne ou Ayrshire.

Par contre, WEINSTEIN et TROUT (17) constatent que le lait provenant de vaches des races Brune des Alpes (Brown, Swiss), Frisonne, Guerneseyaise et Jerseyaise devient également rance après l'homogénéisation.

b) Saveur oxydée.

GUTHRIE et BRUECKNER (110) ne trouvent pas de relation entre l'apparition de ce défaut et la race des vaches laitières, non plus que DAHLE et PALMER (65). Par contre, STEIBNITZ et SOMMER (24) affirment que la matière grasse du lait de vaches Frisonne est plus susceptible à l'oxydation que celle du lait de vaches appartenant à d'autres races, en période d'alimentation hivernale. Ainsi la matière grasse des vaches Guerneseyaises possède, en particulier, une grande stabilité.

BECK, WHITNAH et MARTIN (74) confirment l'opinion émise par STEIBNITZ et SOMMER et trouvent que la saveur oxydée apparaît dans 15,8 et 19,4 p. 100 des échantillons de lait provenant de vaches de race Frisonne et Ayrshire alors qu'il apparaît dans seulement 6,1 et 7,8 p. 100 des échantillons de lait provenant de vaches de race Jerseyaise et Guerneseyaise. Ces auteurs constatent de plus que la coloration moyenne des laits présentant une saveur oxydée est plus faible que celle des laits ne présentant pas ce défaut. L'attribution d'un supplément de carotène aux vaches laitières élimine l'apparition de la saveur oxydée et intensifie la coloration du lait.

KRUKOWSKY et coll. (111) ont signalé la relation existant entre le taux de tocophérol dans le lait et l'apparition de la saveur oxydée et ont montré que ce taux est plus bas dans le lait des vaches de race Frisonne que dans celui des vaches de race Guerneseyaise.

4. — Influence du stade de lactation.

STEIBNITZ et SOMMER (24) ne pensent pas qu'il soit possible de relier les variations de stabilité de la matière grasse du lait au stade de lactation. C'est aussi ce que montrent HERRINGTON et KRUKOWSKY (112) qui ne trouvent aucune corrélation entre la lipolyse spontanée ou provoquée et le stade de lactation. ROHAN et SOMMER (49) précisent que, dans quelques-uns des cas étudiés, on trouve une activité lipolytique croissante vers la fin de la lactation, mais que, pris dans leur ensemble, les résultats ne permettent pas une conclusion définitive.

MATTICK et KAY (51) constatent que si le taux de lipase (tributyrinase) du lait est élevé pendant les premiers jours de la lactation il n'augmente pas en fin de lactation.

Toutefois les observations des éleveurs et certains résultats rapportés par les auteurs (43) concordent pour affirmer qu'en fin de lactation le lait présente très souvent un goût de rance. D'autres auteurs ont précisé que l'activité lipasique est alors plus grande (113, 114, 115).

RASMUSSEN et coll. (116) ont signalé que le contenu en acide ascor-

bique du lait, relativement élevé au début de la lactation, diminue jusqu'à un minimum qui est atteint après 2 mois, et s'élève à nouveau pendant le dernier stade de la lactation. Le lait serait donc plus sensible au développement de la saveur oxydée précisément après les deux premiers mois de la lactation. CORBETT et TRACY (117) ont d'autre part montré que la saveur oxydée se rencontre plus fréquemment dans le lait produit pendant les premiers mois de la lactation.

Cependant BRUECKNER et GUTHRIE (118) n'ont pas trouvé de corrélation entre le stade de lactation et la saveur oxydée du lait. KING et DUNKLEY (119) montrent que d'une façon générale la quantité de cuivre que contient naturellement le lait est élevée au début de la lactation et diminue rapidement au cours des deux premiers mois jusqu'à une valeur qui restera sensiblement uniforme durant le reste de la lactation. Cependant ces auteurs ne trouvent pas de corrélation entre le taux élevé de cuivre dans le lait de début de lactation et la sensibilité plus ou moins grande du lait au développement de la saveur oxydée.

5. — Influence de l'état de santé de la vache laitière.

PROKS et GROH (41) ont signalé que l'état anormal des organes génitaux des vaches laitières pouvait entraîner la production d'un lait présentant un goût défectueux.

Ces auteurs ont montré que le défaut de goût « huileux-rance » peut apparaître avec une intensité variable d'un quartier à l'autre de la mamelle.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Il nous a semblé utile de reprendre en France une étude sur les défauts de goût susceptibles d'apparaître dans le lait. Retrouverait-on les mêmes défauts que ceux signalés par les auteurs étrangers? Serait-il possible de mettre en évidence certains facteurs responsables de l'apparition de ces défauts?

Les résultats obtenus au cours de l'étude poursuivie de janvier 1955 à mars 1957 au Centre National de Recherches Zootechniques de Jouy-en-Josas, permettent de répondre partiellement à ces questions, et nous allons les exposer et les discuter maintenant.

A. — MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

De janvier 1955 à mars 1957, nous avons procédé chaque semaine à des examens organoleptiques sur des laits individuels provenant de vaches du troupeau du C. N. R. Z. de Jouy-en-Josas.

Il y a lieu de distinguer deux périodes : l'une de fin janvier 55 à fin janvier 56, l'autre de février 56 à mars 57.

Au cours de ces deux périodes les modalités du prélèvement des échantillons et celles de l'examen organoleptique ont été légèrement différentes.

1. — Prélèvement.

Les échantillons provenaient de laits individuels, prélevés en moyenne une fois par semaine. En 55, les prélèvements avaient lieu lors de la traite du matin et lors de la traite du soir. En 56, ils étaient effectués, d'une façon générale, lors de la traite du soir.

En 55, on a examiné, avec une fréquence variable, les laits de toutes les vaches en lactation, c'est-à-dire : 5 vaches de race Pie rouge de l'Est, 22 vaches de race Normande et 24 vaches de race Frisonne Pie Noire.

Au cours de la deuxième période d'observation (56-57), les laits de 15 vaches (8 Frisonne Pie Noire, 6 Normandes, et 1 Pie Rouge de l'Est) ont été examinés chaque semaine. Par contre l'examen organoleptique des laits de toutes les vaches en lactation a été effectué quatre fois seulement : en mars 56, en janvier, février et mars 57.

Pour chaque vache, on prélevait, dans deux bouteilles en verre, un échantillon d'un litre et un échantillon d'un demi-litre sur la totalité du lait de la traite.

Aussitôt après la traite, les échantillons de lait étaient rassemblés, les bouteilles capsulées et placées à la glacière (2 à 4°C).

Une pasteurisation basse, au bain-marie (30 minutes à 63°C), était effectuée sur les bouteilles contenant un litre de lait, 4 à 5 heures environ après la traite du matin et 16 à 17 heures après la traite du soir. Les échantillons pasteurisés et refroidis étaient ensuite placés à la glacière.

L'examen organoleptique avait lieu le surlendemain, soit 48 heures après la pasteurisation et concernait le lait cru d'une part, le lait pasteurisé d'autre part.

2. — Examen organoleptique.

Les échantillons ont été examinés en 55 par un seul expert et en 56 par un groupe de 4 à 6 experts ; les appréciations personnelles étaient

confrontées, et au besoin révisées, avant la rédaction de l'appréciation finale.

L'examen organoleptique était pratiqué sur les échantillons de lait réchauffés à 30-35°C.

Au cours de l'examen organoleptique, nous avons relevé les défauts de goût bien connus : goût de rance, saveur oxydée (ce terme étant réservé à la saveur métallique, au goût de papier ou de carton), enfin goût de « nourriture ». Certains goûts provenant de la nourriture étaient facilement discernables dans certains cas (goût de betterave, d'ensilage, d'herbe) et dans d'autres cas n'ont pu être attribués avec précision à tel ou tel aliment.

Nous avons rencontré des laits présentant un goût spécial que nous avons parfois défini par analogie (goût d'eau de vaisselle, de bois, de terre, de feuilles mortes, de champignon) et que plus souvent, nous n'avons pas su définir. Le goût de cuit a été assez souvent rencontré, les goûts de brûlé et de caramel très rarement. Le goût de cuit est délicat à apprécier : quand on examine un grand nombre d'échantillons à la fois, on s'y habitue en effet très vite. Dans l'estimation statistique de l'ensemble des résultats de nos observations, seul un goût de cuit très prononcé, et rendant le lait nettement désagréable à boire, a été appelé défaut. Le reste du temps, nous avons noté l'apparition du goût de cuit mais le lait a été considéré comme passable.

Les différents défauts de goût que nous venons d'énumérer peuvent se rencontrer simultanément sur le même échantillon. Ainsi nous avons relevé les associations suivantes : oxydé-nourriture, oxydé-betterave, rance-betterave, betterave-ensilage.

Nous avons de plus rencontré des laits présentant une saveur sucrée ou salée. La saveur salée n'a pas été considérée comme un défaut.

Au cours de l'examen organoleptique nous avons distingué les « très bons laits » des « bons laits » et des laits « assez bons ». Mais nous avons rassemblé ces trois catégories et qualifié l'ensemble de « bons laits » pour la présentation statistique des observations. Nous avons procédé de la même façon pour les laits jugés fades, plats, « ni bons ni mauvais » et passables, que nous avons également rassemblés. Nous les avons parfois réunis aux « bons laits », et parfois nous les avons présentés séparément. Les indications voulues sont données chaque fois que cela est nécessaire dans la suite du texte. Il est important de signaler que l'examen organoleptique était sévère et que les échantillons qui ne sont pas classés dans la catégorie des « bons laits » possédaient cependant des qualités organoleptiques, qui, dans beaucoup de cas les auraient fait considérer comme acceptables pour le consommateur.

B. — RÉSULTATS

1. — Influence de la saison sur l'apparition des défauts de goût.

Le tableau I et les figures 1*a* et 1*b* donnent les résultats de l'ensemble des examens organoleptiques que nous avons effectués sur les échantillons de laits individuels crus et pasteurisés provenant des vaches du troupeau du Centre National de Recherches Zootechniques, pendant les années 55, 56, 57. 1118 échantillons de lait cru et 1053 échantillons de lait pasteurisé ont été examinés.

Dans le tableau I et sur les figures 1*a* et 1*b*, les laits répondant aux qualifications suivantes : très bon, bon, assez bon, passable, ni bon ni mauvais, plat, fade, aqueux, ont été groupés dans la catégorie « bons laits ». Les laits présentant un goût de rance léger ou accentué ont été groupés dans une même catégorie. Il en a été de même pour la saveur oxydée.

On peut constater qu'à aucune période de l'année le pourcentage maximum de 100 p. 100 de « bons laits » n'est atteint. Les valeurs les plus élevées sont pour les laits crus de 90,7 p. 100 en juillet et pour les laits pasteurisés de 96,2 p. 100 en août.

Les valeurs les plus faibles sont observées pendant la période de stabulation. Les dates de mise à l'herbe du troupeau ont été : 18-4-55, 5-5-56 et 16-4-57. Les dates de rentrée à l'étable : 21-10-55 et période du 22 au 30-10-56. D'octobre à mai les proportions moyennes de « bons laits » sont de 49,8 p. 100 pour les laits crus et de 63,1 p. 100 pour les laits pasteurisés, alors que ces proportions s'élèvent à 78,7 p. 100 et 82,8 p. 100 pendant la période de mai à octobre.

Gout de rance. — Ce défaut apparaît au cours de toute l'année, mais, alors qu'il est noté pendant les mois de mai, juin et juillet sur 4,9, 10,5 et 1,9 p. 100 des échantillons de lait cru examinés, il est relevé pendant les autres mois sur 19,2 à 45,7 p. 100 des échantillons examinés.

Saveur oxydée. — Ce défaut n'est relevé de façon appréciable que de novembre à fin mars. Il est particulièrement accentué en janvier et février.

Gout de nourriture. — Ce défaut se rencontre toute l'année ; il paraît cependant plus accentué au printemps et à l'automne. Le défaut de goût d'ensilage s'observe dès novembre, c'est-à-dire dès la distribution de l'ensilage aux vaches laitières.

TABLEAU I

Proportions des « bons laits » et des laits présentant un défaut de goût exprimées en % du total des échantillons examinés.

Mois	Bon	Rance	Oxydé	Betterave	Oxydé-Betterave	Oxydé-rance	Betterave-Ensilage	Rance-Betterave	Nourriture	Ensilage	Ensilage pourri	Terre, bois, herbe, champ.	Goût de vache	Eau de vaisselle	Spécial	Mauvais	Sucré	Salé	Cuit
Lait cru :																			
Janvier	54,3	21,7	17,4		1,5									0,7	2,2	2,2		*4,4*	
Février	46,0	24,8	6,6	10,2	1,5	0,7	2,2	1,5	0,7						2,2	3,6			
Mars	52,0	21,7	4,6	10,3		0,6	2,3	2,3							3,3	2,9			
Avril	48,8	29,6		7,2		5,6			4,0						3,2	1,6		*0,8*	
Mai	78,6	4,9	2,0						3,9						6,7	3,9			
Juin	79,0	10,5							1,8						6,9	1,8		*5,3*	
Juillet	90,7	1,9							3,6			1,9	1,9					*3,7*	
Août	78,2	20,0													1,8			*7,3*	
Septembre	67,2	23,0		1,6								3,4	1,6		1,6	1,6		*1,6*	
Octobre	53,4	19,2		5,4								13,7	1,4		1,4	5,5		*6,9*	
Novembre	54,2	24,6	10,6								6,5			1,0	1,1	2,0	*1,1*	*3,2*	
Décembre	41,3	45,7	4,3								4,3			2,2	2,2		*6,5*	*2,2*	*2,2*
Lait pasteurisé																			
Janvier	57,0	17,0	19,0	1,0	1,0	1,0									1,0	3,0		*4,0*	*10,0*
Février	63,2	8,0	14,4	4,0	2,4	0,8	4,0		1,6		0,8				0,8			*2,4*	*4,0*
Mars	65,5	4,7	4,7	7,0	3,5		0,6		0,6					0,6	2,8	8,8		*4,7*	*9,4-1,2*
Avril	68,8	8,0		10,4	0,8				2,4						4,0	2,4		*0,8*	*7,2-3,2*
Mai	71,3	3,0	4,0						5,9						4,9	1,9			*5,0-9,0*
Juin	86,0		1,7	1,8					1,7						3,5	3,5		*5,7*	*7,0-1,8*
Juillet	90,7		1,9						3,8				1,8		1,8				
Août	96,2	1,9													1,9			*7,5*	*1,9*
Septembre	71,5	7,9							3,2						11,0	3,2		*3,2*	*4,8-3,2*
Octobre	52,2	7,2		2,9					7,3			21,7			5,8	2,9		*5,8*	*5,8*
Novembre	57,7	8,9	16,7							2,2	5,7			1,1	1,1	4,4		*2,2*	*2,2-2,2*
Décembre	77,2	13,7									4,5					2,3		*4,5*	*15,9-2,3*

Les échantillons correspondant aux proportions portées en italique ont été classés dans la catégorie « bons laits » (cf texte, 2e partie, A2-examen organoleptique).

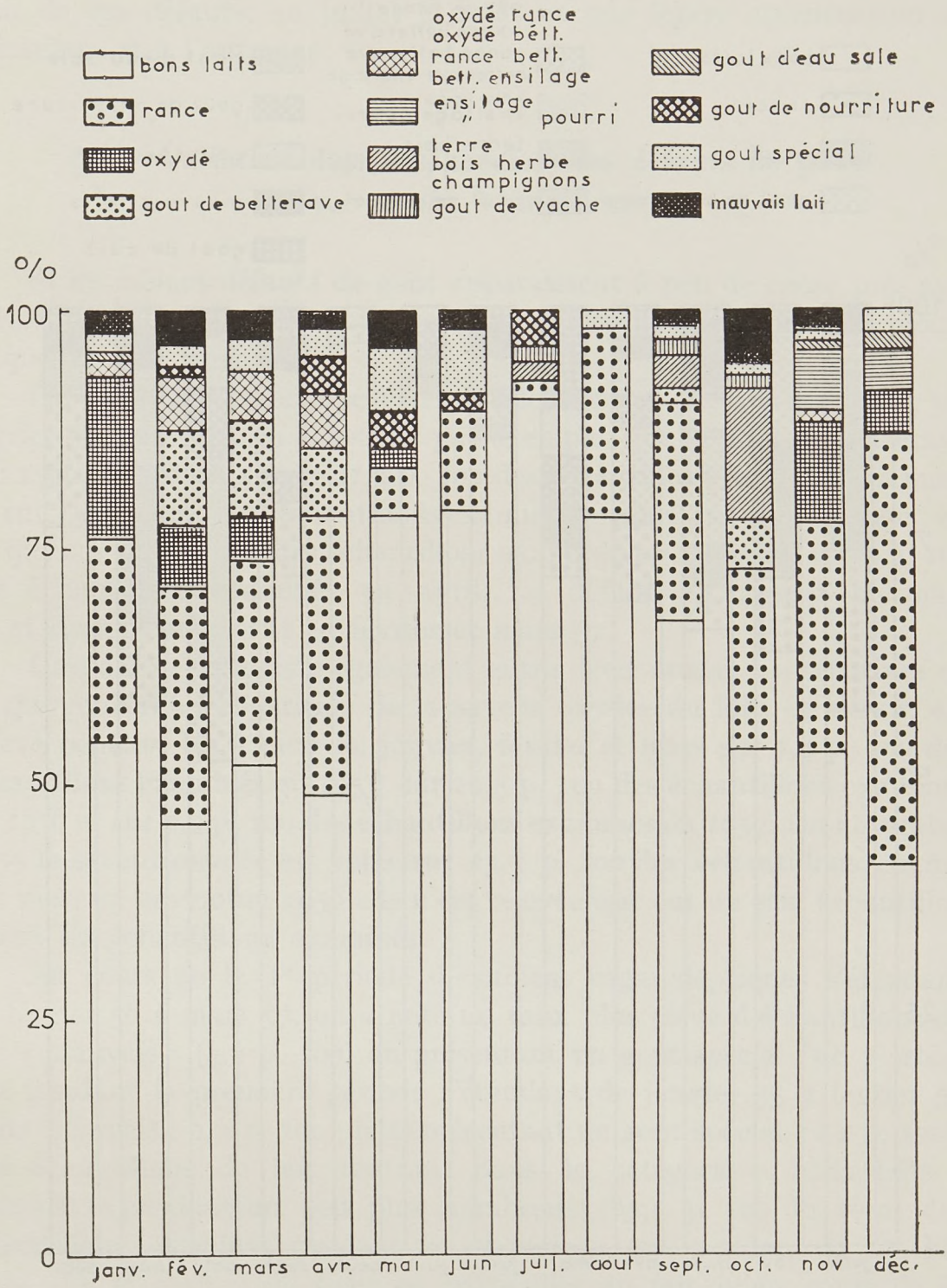


FIG. 1 *a*. — Proportions de « bons laits » et de laits présentant un défaut de goût, exprimées en pourcentage des échantillons de lait cru examinés.

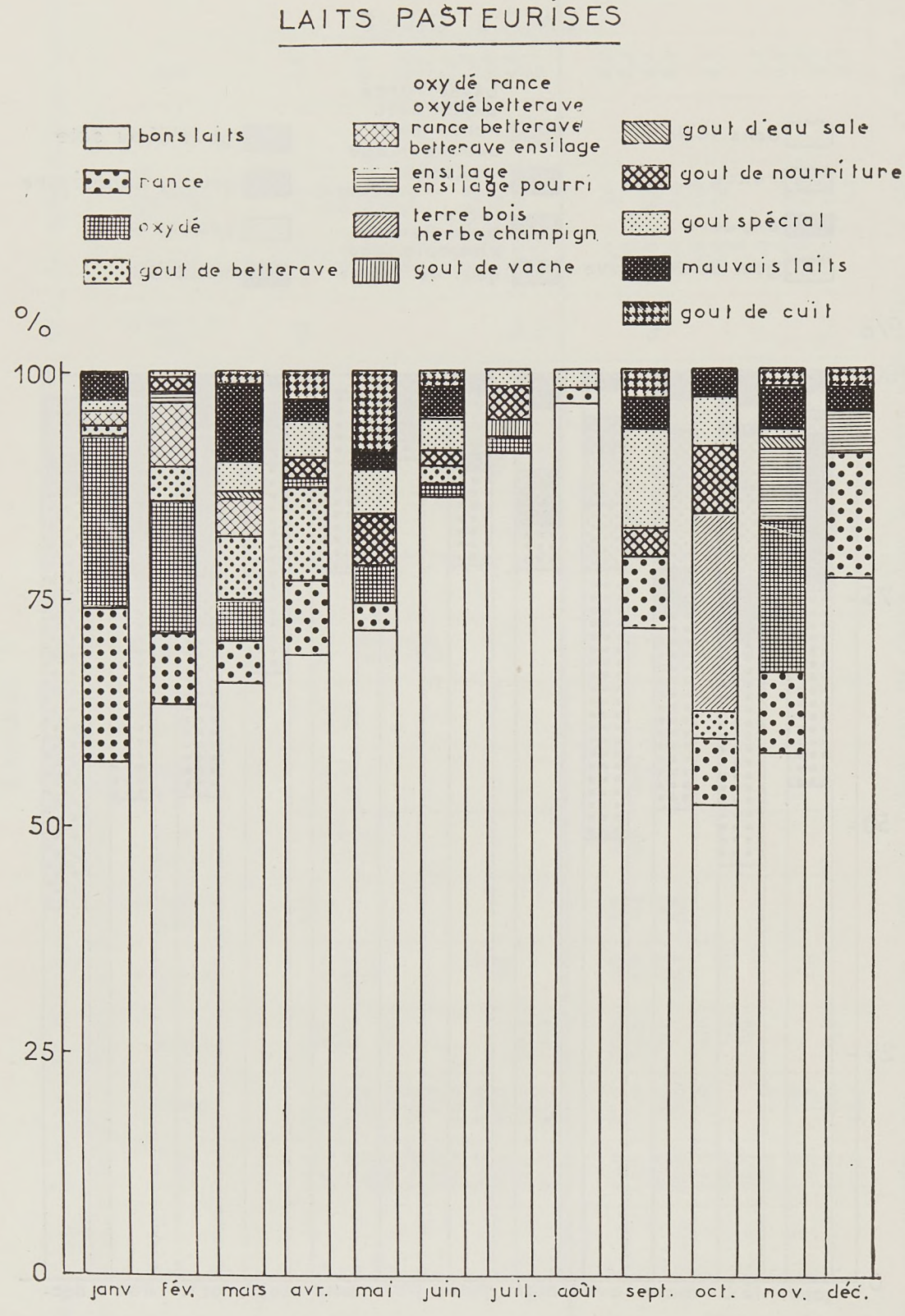


FIG. 1 *b*. — Proportion de « bons laits » et de laits présentant un défaut de goût, exprimées en pourcentage des échantillons de lait pasteurisé examinés.

Gout de cuit. — Ce défaut propre au lait pasteurisé a été relevé souvent au printemps et au début de l'automne.

Les laits présentant un goût spécial où les laits « mauvais » se rencontrent à toute époque de l'année. On note cependant une nette diminution de ces défauts, en juillet et août et une légère accentuation au printemps et à l'automne.

2. — Variation dans l'apparition des défauts de goût, d'une année à une autre.

Si les mêmes défauts de goût apparaissent à peu de chose près aux mêmes périodes, ils peuvent être plus fréquents une année, et moins fréquents une autre année.

Si l'on sépare les deux périodes d'observations (janvier 55-janvier 56, février 56-mars 57), on constate, par exemple, que le goût de betterave qui apparaissait en 55 sur 21,4 p. 100 des échantillons examinés en mars et sur 13,7 p. 100 des échantillons examinés en avril, n'apparaît plus, en 56 que sur 11,7 p. 100 des échantillons examinés en février et sur 1 p. 100 des échantillons examinés en avril. Le défaut est absent en mars 56 et également absent en février et mars 57.

Une différence existe également entre deux années consécutives en ce qui concerne l'apparition de la saveur oxydée du lait. Ce défaut est relevé pendant les 3 mois de janvier, février et mars sur 7,4 p. 100 des échantillons examinés en 1955, sur 20,5 p. 100 des échantillons examinés en 1956 et sur 7,3 p. 100 des échantillons examinés en 1957. En novembre 1955 la saveur oxydée est notée sur 25,3 p. 100 des échantillons examinés mais en novembre 1956 elle n'est relevée que sur un seul échantillon parmi 82 échantillons examinés.

Au cours de la 2e période d'examens organoleptiques s'étendant de février 56 à mars 57, on a noté un taux plus élevé d'échantillons de lait « mauvais » (4,3 p. 100) ou présentant un goût spécial (3,8 p. 100), que pendant la première période s'étendant de janvier 55 à février 56 (laits mauvais : 0,7 p. 100 ; laits présentant un goût spécial : 2,2 p. 100). Les échantillons de lait rentrant dans la catégorie « bons laits » restaient cependant un peu plus nombreux (65,5 p. 100 du total des échantillons examinés pendant la 2e période que pendant la 1re période (61 p. 100). Ceci tient en particulier au fait qu'au cours de la 2e période, les laits présentant une saveur oxydée ou un goût de betterave étaient beaucoup moins nombreux qu'au cours de la première période. (1re période, saveur oxydée 8,3 p. 100, goût de betterave 8,4 p. 100 ; 2e période, saveur oxydée 3,7 p. 100, goût de betterave 0,5 p. 100.)

3. — Influence de la pasteurisation.

Nous précisons que la pasteurisation a toujours été effectuée dans les mêmes conditions et toutes précautions ont été prises pour empêcher l'exposition du lait à la lumière solaire.

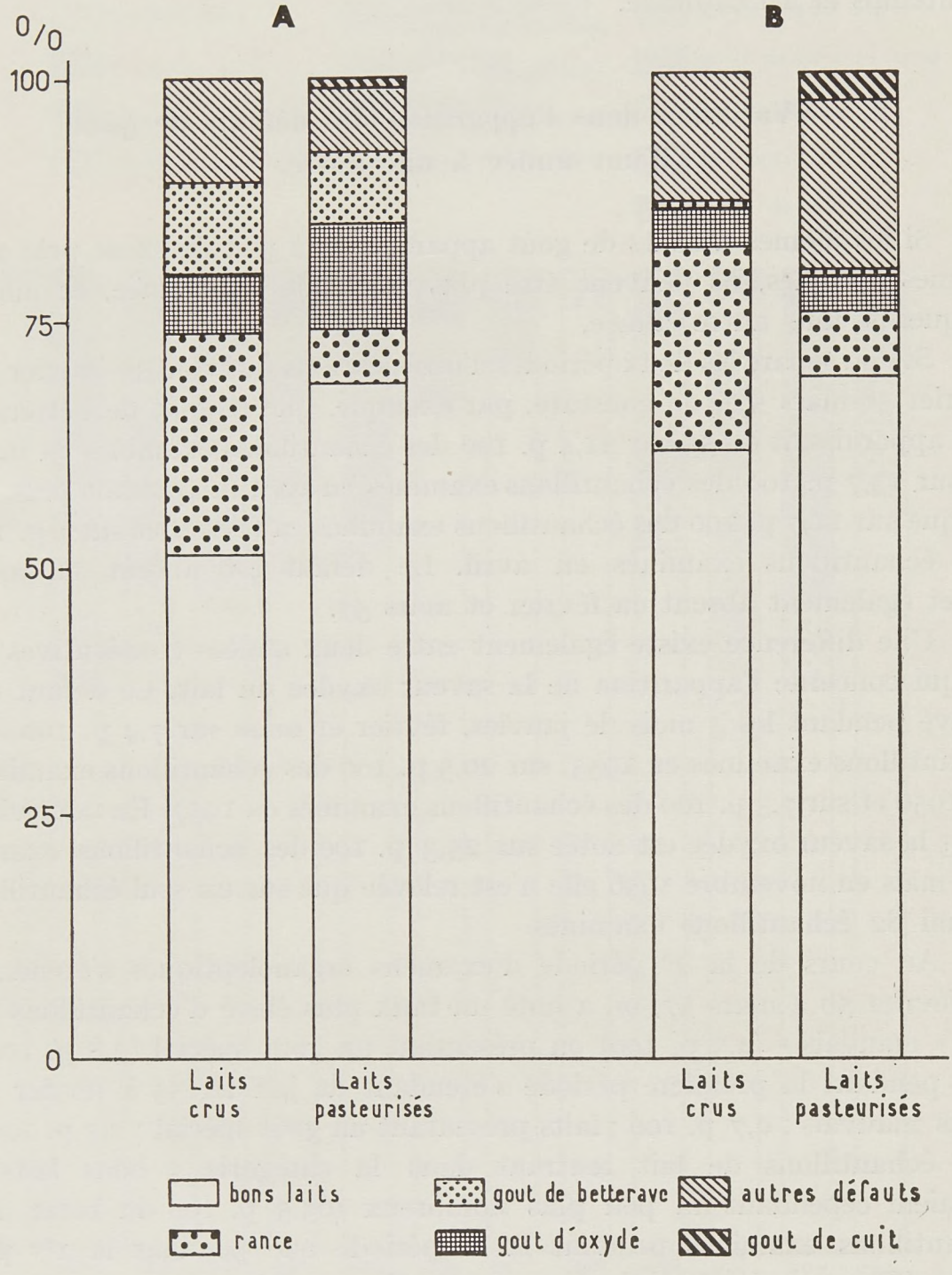


FIG. 2. — Influence de la pasteurisation sur l'apparition des défauts de goût du lait.
A : 1re période d'observation : janvier 55-janvier 56.
B : 2e période d'observation : février 56-mars 57.

Dans le tableau I et sur les figures 1*a* et 1*b*, les résultats concernant les laits crus et les laits pasteurisés étant séparés, l'influence de la pasteurisation est déjà visible, à savoir que la proportion de « bons laits » est

plus élevée dans la catégorie des laits pasteurisés que dans celle des laits crus. Le même résultat apparaît dans le tableau II et sur la figure 2 où l'on présente les différents pourcentages d'échantillons de lait examinés (lait cru et lait pasteurisé) rentrant dans la catégorie des « bons laits » ou des laits présentant tel ou tel défaut de goût. Les résultats se rapportant aux deux périodes d'observations sont présentés séparément.

Nous examinerons l'influence de la pasteurisation sur l'apparition des différents défauts de goût dans le lait.

Gout de rance. — Ce défaut apparaît beaucoup plus souvent dans le lait cru que dans le lait pasteurisé. Mais il est cependant présent dans ce dernier. En effet, la pasteurisation des échantillons n'avait lieu dans nos essais que 4 à 5 heures après le prélèvement des échantillons de lait de la traite du matin et 16 à 17 heures après le prélèvement des échantillons de lait de la traite du soir. Un début d'hydrolyse de la matière grasse du lait pouvait donc se produire pendant ce laps de temps, spécialement dans le cas des laits riches en lipase.

La pasteurisation détruit la lipase du lait et arrête donc tout développement de la lipolyse.

Saveur oxydée. — Ce défaut est plus souvent relevé sur les échantillons de lait pasteurisé que sur les échantillons de lait cru, du moins en ce qui concerne la première période d'observation (janvier 55-janvier 56). Nous relevons 10,7 p. 100 d'échantillons de lait pasteurisé présentant une saveur oxydée contre 6,1 p. 100 d'échantillons de lait cru présentant également cette saveur. De février 56 à mars 57 (2e période d'observation) nous ne retrouvons pas une différence analogue. Il est vrai que pendant cette période l'apparition de la saveur oxydée a été rarement observée.

Gout de cuit. — Le goût de cuit est particulier au lait pasteurisé. Toutefois nous avons rencontré un échantillon de lait cru présentant un goût de cuit à côté d'un goût de rance (lait de Pivoine, prélèvement du 5 décembre 1956 matin) ; un goût de caramel a été relevé sur ce même échantillon ayant subi la pasteurisation.

Gout de betterave, gout de nourriture. — Pendant la première période d'observation (janvier 55-janvier 56) le goût de betterave a été relevé un peu plus souvent (9,1 p. 100 des échantillons examinés) sur les échantillons de lait cru que sur les échantillons de lait pasteurisé (7,6 p. 100 des échantillons examinés). Par contre, pendant la deuxième période d'observation (février 56-mars 57) le goût de nourriture se rencontre dans 3 p. 100 des échantillons de lait pasteurisé et dans 2 p. 100 des échantillons de lait cru. Mais, d'une façon générale les goûts divers de nourriture et certains goûts « spéciaux » que nous avons définis par analogie avec des goûts connus, se rencontrent aussi bien dans les échan-

TABLEAU II

Influence de la pasteurisation

Proportions des « bons laits » et des laits présentant un défaut de goût, exprimées en % du total des échantillons examinés

1ere *période d'observation :* Janvier 1955 — Janvier 1956.

	Bon	Rance	Oxydé	Better.	Better-ensil.	Better-ensil-oxydé	Rance-oxydé	Rance-better.	Oxydé-better.	Goût de vache	Goût d'herbe	Spécial	Mauvais	Cuit	Salé*
Lait cru	52,8	22,6	6,1	9,1	1,5	—	0,4	2,4	0,8	0,2	0,4	2,6	1,1	—	1,3
Lait pasteurisé ..	69,4	5,6	10,7	7,6	—	0,5	—	—	2,4	0,2	0,2	2,2	0,2	1,0	0,7

2eme *période d'observation* : Février 1956 — Mars 1957.

	Bon	Plat fade passable	Rance	Oxydé	Better.	Better-Oxydé	Rance-Oxydé	Rance-Better.	Nourrit.	Terre, bois, herbe, eau sale, ensil., ensil. pourri	Goût spécial	Mauvais	Cuit
Lait cru.....	55,9	6,0	20,4	4,0	0,6	—	0,5	0,3	2,0	3,9	3,0	3,4	0
Lait pasteurisé..	64,8	4,4	6,7	3,6	0,5	0,1	0,1	—	3,0	4,4	4,5	5,3	2,6

* La saveur salée n'a pas été classée comme un défaut de goût.

tillons de lait pasteurisé que dans les échantillons de lait cru. Ainsi au cours d'une même période de quelques semaines (octobre, novembre 1956) nous trouvons, sur des échantillons de lait cru, quatre laits présentant un goût « d'eau de vaisselle », huit laits présentant un « goût d'ensilage pourri », un lait présentant un « goût de foin fermenté », deux laits présentant un « goût de vache », deux laits présentant un « goût d'herbe » et neuf laits présentant un « goût de terre ». Sur les échantillons de lait pasteurisé correspondants nous relevons deux laits présentant un « goût d'eau de vaisselle », deux laits présentant un « goût d'ensilage pourri », deux laits présentant un « goût d'herbe » et quatorze laits présentant un « goût de terre ».

MAUVAIS LAITS, GOUTS SPÉCIAUX NON DÉFINIS. — En 56-57 on relève davantage de mauvais laits parmi les laits pasteurisés (5,3 p. 100) que parmi les laits crus (3,4 p. 100). Il en est de même pour les échantillons de lait présentant un goût spécial non défini (4,5 p. 100 des échantillons de lait pasteurisé et 3,0 p. 100 des échantillons de lait cru).

4. — Influence de la race.

Les échantillons de lait examinés proviennent de vaches appartenant à trois races : Frisonne-Pie Noire (1079 échantillons, 28 vaches), Normande (880 échantillons, 23 vaches), Pie Rouge de l'Est (212 échantillons, 5 vaches).

Dans le tableau III et sur la figure 3 nous présentons séparément les résultats des examens organoleptiques effectués sur les échantillons de lait provenant des vaches appartenant à chacune de ces trois races. Pour chaque race, nous avons calculé les différents pourcentages de « bons laits » et de laits présentant un défaut de goût.

On présente séparément les résultats obtenus au cours des deux périodes d'observation et pour la deuxième période (février 56-mars 57), les résultats se rapportant au lait pasteurisé et au lait cru.

Au cours de la première période d'observation nous constatons que la proportion la plus faible d'échantillons de « bons laits » se rapporte aux échantillons provenant de vaches de race Pie Rouge de l'Est. Ceci est dû à l'apparition fréquente du goût de betterave sur les échantillons provenant de cette race. En effet, pendant la deuxième période d'observation, au cours de laquelle le goût de betterave a été rarement observé (mais cependant toujours plus fréquemment sur les échantillons correspondant à la race Pie Rouge de l'Est) la proportion des « bons laits » est plus élevée parmi les échantillons correspondant à cette race que parmi ceux correspondant aux races Normande ou Frisonne Pie Noire. C'est pour cette dernière race que la proportion de « bons laits », est alors la plus faible parmi les laits crus comme parmi les laits pasteurisés.

TABLEAU III

Influence de la race des vaches laitières

Proportions des "bons laits" et des laits présentant un défaut de goût, exprimées, pour chaque race de vaches laitières en % du total des échantillons examinés correspondant à chacune des races.

1re période d'observation : janvier 1955–janvier 1956.

Race	Bon	Rance	Oxydé	Better.	Better-Ensil.	Better. Ensil. Oxyde	Rance-Oxydé	Rance-Better.	Oxydé-Better.	Goût d'herbe	Goût de vache	Goût spécial	Mauvais	Cuit	Salé
Normande	66,9	17,1	6,0	5,8	—	—	—	1,1	0,5	0,3	—	1,3	0,5	0,5	*1,8*
Frisonne Pie Noire ...	63,6	15,5	10,0	5,1	0,6	—	0,6	1,1	0,9	0,6	0,3	1,4	—	0,3	—
Pie Rouge de l'Est...	36,7	5,6	9,8	22,7	3,5	1,4	—	2,1	6,3	—	0,7	7,7	2,8	0,7	*1,4*

2e période d'observation : février 1956–mars 1957.

Race	Nombre d'échantillons examinés	Bon	Passable Plat Fade	Légert. Rance	Rance, tr. Rance	Légert. Oxydé	Oxydé, tr. Oxydé	Betterave	Oxydé-Betterave	Oxydé-Rance	Nourriture	Ensil.	Ensil. pourri	Goût de vache	Eau de vaisselle	Herbe, terre, bois, champ.	Spécial	Mauvais	Cuit	Salé
Lait cru																				
Normande	251	63,3	6,0	6,4	9,5	1,6	2,0	—	—	0,8	2,0	—	—	0,8	0,4	0,8	3,2	3,2	—	*1,6*
Frisonne Pie Noire..	365	49,0	6,4	10,0	14,8	1,4	2,6	—	—	0,3	3,1	0,5	1,1	0,8	0,8	2,4	2,4	4,4	—	*4,1*
Pie Rouge de l'Est..	35	75, 9	3,0	3,0	—	3,0	—	6,1	—	—	3,0	—	—	—	—	3,0	3,0	—	—	—
Lait Pasteurisé																				
Normande	243	69,2	5,4	2,0	2,6	0,8	2,0	0,4	—	—	2,0	—	0,4	—	0,8	1,6	3,3	8,7	0,8 — *8,2*	*3,3*
Frisonne Pie Noire..	358	61,9	3,9	2,7	4,4	0,6	2,8	0,3	0,3	0,3	3,4	0,6	1,4	—	—	2,8	4,5	6,7	3,4 — *9,5*	*5,1*
Pie Rouge de l'Est..	35	62,8	2,9	—	—	—	2,9	5,7	—	—	11,3	—	—	—	—	2,9	8,6	2,9	— *5,8*	*17,0*

Les échantillons correspondant aux proportions portées en italique ont été classés dans la catégorie « bons laits » (Cf texte, 2e partie, A2-examen organoleptique.

GOUT DE RANCE. — Nous rencontrons peu de « goût de rance » parmi les échantillons provenant de vaches de race Pie Rouge de l'Est.

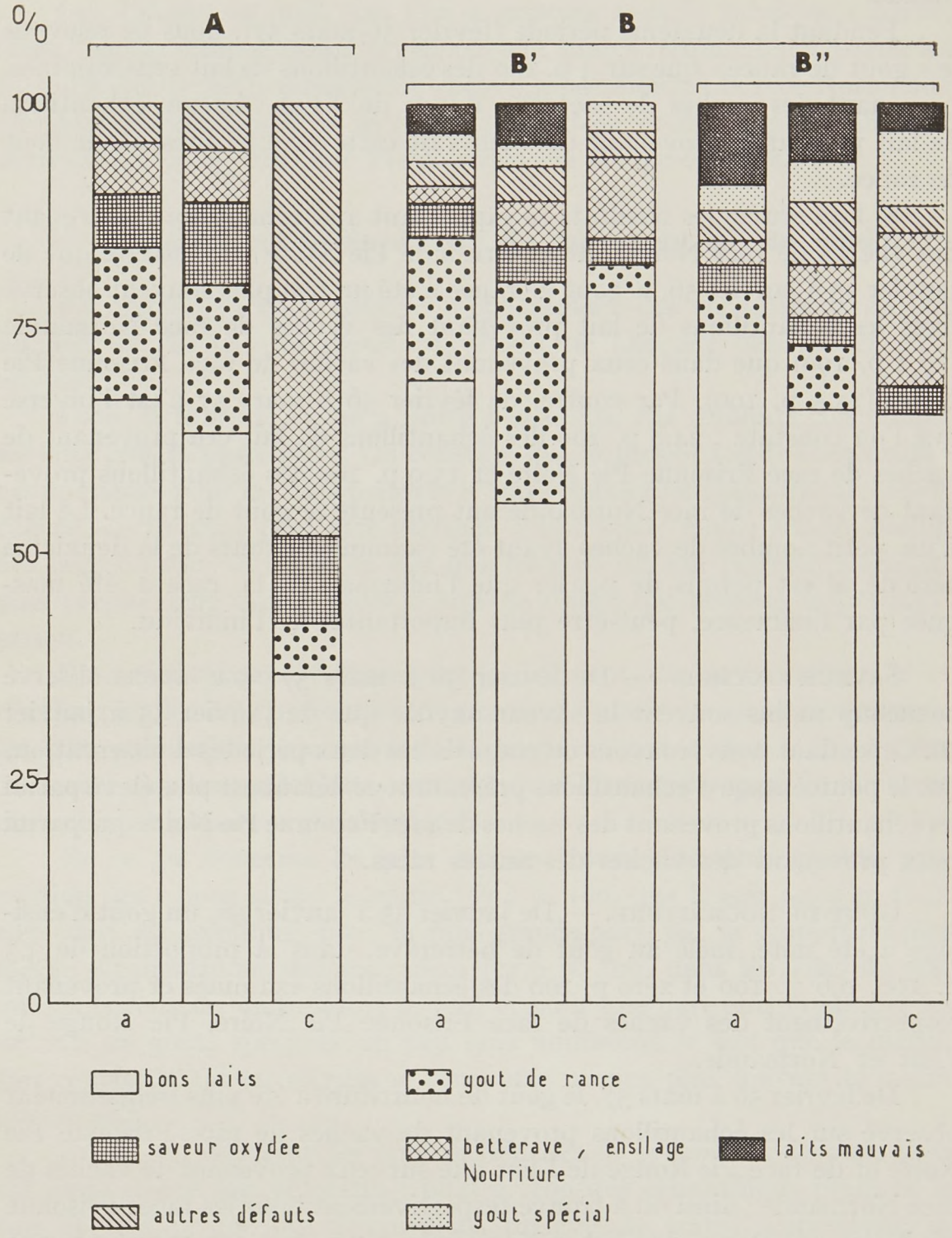


FIG. 3. — Influence de la race des vaches laitières sur l'apparition des défauts de goût du lait.
A : 1re période d'observation : janvier 55-janvier 56.
B : 2e période d'observation : février 56-mars 57.
B' : laits crus.
B'' : laits pasteurisés.
a : race Normande ; *b* : race Frisonne Pie Noire ; *c* : race Pie Rouge de l'Est.

Pendant la première période (janvier 55-janvier 56) nous notons ce défaut sur 5,6 p. 100 des échantillons provenant des vaches de cette

race, alors que nous le relevons sur 15,5 p. 100 et 17,1 p. 100 des échantillons provenant des vaches de race Frisonne Pie Noire et de race Normande.

Pendant la deuxième période (février 56-mars 57), nous ne relevons le « goût de rance » que sur 3 p. 100 des échantillons de lait cru examinés, provenant des vaches de race Pie Rouge de l'Est. Aucun échantillon de lait pasteurisé provenant de vaches de cette race ne présente le goût de rance.

Si l'on étudie les résultats se rapportant aux échantillons provenant des vaches de race Normande et Frisonne Pie Noire on constate que de janvier 55 à janvier 56, le goût de rance a été un peu plus souvent observé dans les échantillons de lait provenant des vaches de race Normande (17,1 p. 100) que dans ceux provenant des vaches de race Frisonne Pie Noire (15,5 p. 100). Par contre, de février 56 à mars 57 c'est l'inverse que l'on constate : 24,8 p. 100 des échantillons de lait cru provenant de vaches de race Frisonne Pie Noire et 15,9 p. 100 des échantillons provenant de vaches de race Normande ont présenté le goût de rance. Le lait d'un petit nombre de vaches ayant été examiné au cours de la deuxième période, il est permis de penser que l'influence de la race a été masquée par l'influence, peut-être plus importante, de l'individu.

Saveur oxydée. — De février 56 à mars 57 nous avons observé beaucoup moins souvent la saveur oxydée que de janvier 55 à janvier 56. Cependant nous trouvons au cours de ces deux périodes d'observation, que le pourcentage d'échantillons présentant ce défaut est plus élevé parmi les échantillons provenant des vaches de race Frisonne Pie Noire que parmi ceux provenant des vaches des autres races.

Gout de nourriture. — De janvier 55 à janvier 56, un goût d'ensilage a été noté, mêlé au goût de betterave, dans la proportion de 3,5 p. 100, 0,6 p. 100 et zéro p. 100 des échantillons examinés et provenant respectivement des vaches de race Frisonne Pie Noire, Pie Rouge de l'Est et Normande.

De février 56 à mars 57, le goût de nourriture a été plus fréquemment observé sur les échantillons provenant de vaches de race Frisonne Pie Noire et de race Pie Rouge de l'Est que sur ceux provenant de vaches de race Normande ; ainsi on a trouvé respectivement pour les races Frisonne Pie Noire, Pie Rouge de l'Est et Normande, 3,1 p. 100, 3 p. 100 et 2 p. 100 des échantillons de lait examinés présentant le goût de nourriture. Ces pourcentages se sont élevés à 3,4 p. 100, 11,4 p. 100 et 2 p. 100 respectivement pour les laits pasteurisés.

Les défauts que nous avons appelés « goût d'ensilage » et « goût d'ensilage pourri » ont été relevés sur des échantillons de lait cru provenant de vaches Frisonne Pie Noire seules et sur les huit cas signalés

de ces mêmes défauts concernant les laits pasteurisés, 7 ont été relevés sur des échantillons de lait provenant de vaches de race Frisonne Pie Noire.

Les défauts de goût que l'on a groupés sous la rubrique « herbe, terre, feuilles mortes, bois » se rencontrent moins fréquemment parmi les échantillons de lait provenant de vaches appartenant à la race Normande que parmi les échantillons de lait provenant de vaches appartenant aux deux autres races, Frisonne Pie Noire et Pie Rouge de l'Est.

5. — Qualité comparée du lait du soir et du lait du matin.

En 1955-1956 on a prélevé régulièrement des échantillons de lait du soir et de lait du matin provenant de chacune des vaches examinées.

Dans le tableau IV on a porté l'ensemble des résultats concernant les laits crus et pasteurisés. On constate que la proportion de « bons laits » est inférieure pour les laits prélevés le soir ; ceux-ci sont plus fréquemment rances. Ce résultat peut être attribué à une réelle moins bonne qualité des laits du soir, ou tenir au fait que les laits du soir peuvent s'altérer, plus précisément rancir, dans le laps de temps qui précède la pasteurisation.

On a donc comparé d'une part les laits crus du matin et du soir et d'autre part les laits pasteurisés du matin et du soir. Les laits crus comme les laits pasteurisés provenant de la traite du soir restent à la glacière 12 heures de plus que les laits correspondant du matin puisqu'ils subissent ensemble l'examen organoleptique.

En ce qui concerne les laits crus on trouve une plus grande proportion des « bons laits » le matin (57,2 p. 100) que le soir (46,4 p. 100). Cet écart est expliqué, pour la plus grande part, par la proportion plus élevée d'échantillons delaits rances (27,0 p. 100) dans les laits du soir que dans ceux du matin (20,3 p. 100) et pour une part plus faible par les défauts de goûts spéciaux un peu plus nombreux le soir que le matin. Par contre, la saveur oxydée se rencontre un peu plus souvent le matin que le soir.

En ce qui concerne les laits pasteurisés la proportion de bons laits est équivalente soir et matin : 68,6 p. 100 des échantillons prélevés le soir et 70,2 p. 100 des échantillons prélevés le matin. Cependant, et nous en avons déjà expliqué la raison, nous rencontrons davantage de laits présentant le défaut de rance le soir que le matin : 7,8 p. 100 contre 3,5 p. 100. Par contre, le défaut d'oxydé apparaît nettement plus souvent le matin (13,4 p. 100) que le soir (7,8 p. 100).

Les autres défauts de goût que présentent les laits pasteurisés apparaissent avec la même fréquence soir et matin.

Tableau IV

Proportions des « bons laits » et des laits présentant un défaut de goût, dans le lait de la traite du matin et le lait de la traite du soir. (Proportions exprimées en % du total des échantillons examinés).

1re *période d'observation* : Janvier 1955 — Janvier 1956.

	Bon plat fade	Rance	Oxydé	Better.	Better. ensil.	Better. ensil. oxydé	Rance Better.	Goût de vache	Goût d'herbe	Rance oxydé	Oxydé better.	Spécial	Mauvais	Cuit	Salé*
Lait du matin ..	64,5	11,0	9,5	8,3	0,7	0,2	1,2	—	—	0,2	1,7	2,0	0,2	0,5	*1,2*
Lait du soir	56,5	18,5	6,3	9,5	1,0	0,2	1,2	0,5	0,7	0,2	1,7	2,7	0,7	0,3	*1,0*

2e *période d'observation* : Février 1956 — Mars 1957.

	Bon plat fade	Rance	Oxyde	Better.	Better. ensil.	Better. ensil. oxyde	Rance better.	Rance better.	Oxyde better.	Goût de vache	Goût de d'herbe	Goût spécial	Mauvais	Cuit	Salé
Lait cru															
Lait du matin ..	57,2	20,3	5,7	9,6	1,4		2,4	0,5	1,0	—	—	1,4	0,5	—	*0,9*
Lait du soir	46,4	27,0	4,8	10,6	1,9		2,4	0,5	1,0	0,5	0,5	3,4	1,0	—	*1,9*
Lait pasteurisé															
Lait du matin ..	70,2	3,5	13,4	6,9	—	0,5	—	—	2,0	—	—	2,5	—	1.0	*1,5*
Lait du soir	68,6	7,8	7,8	7,9	—	0,5	—	—	2,9	0,5	1,0	2,0	0,5	0,5	—

* Les échantillons de lait « salé » ont été classés dans la catégorie « bon, plat, fade ».

6. — Influence du stade de lactation.

Pendant la période janvier 55-janvier 56, les examens organoleptiques ont porté sur des échantillons de laits provenant de toutes les vaches en lactation, mais on n'a pas examiné régulièrement, comme cela a été fait en 56-57, le lait de plusieurs vaches au cours d'une lactation complète.

Cependant en 1955, on connaît pour chaque échantillon le nombre de jours qui sépare le jour du vêlage du jour du prélèvement. Si ce nombre moyen de jours se rapportant à des échantillons présentant un certain défaut de goût est très différent de la moyenne générale de ce même délai, on peut admettre qu'il existe une relation entre ce défaut de goût et le stade de lactation.

La moyenne générale qui sépare lejour du vêlage du jour du prélèvement pour l'ensemble des échantillons est de 145 jours. Elle est de 164 jours pour les échantillons présentant le goût de rance, de 115 jours pour ceux présentant le goût de betterave, et seulement de 60 jours pour les échantillons présentant une saveur oxydée.

Au cours de la deuxième période d'observation nous avons examiné régulièrement le lait de 6 vaches (Pervenche 21 H, Cabale 6 N, Hortensia 22 H, Pivoine 8 H, Pietje 23 H, Unité 26 H) du début à la fin de la lactation, le lait de Laura 32 H, au cours d'une lactation à l'exception des deux premiers mois, le lait de Baby 101 N au cours des dix derniers mois, et des 5 premiers mois de la lactation suivante et le lait de Belladone 30 H au cours des 7 derniers mois d'une lactation et des trois premiers mois de la lactation suivante. Les laits de Pastille 9 N et d'Eglantine 18 H ont été observés régulièrement depuis les vêlages de février et mars 56, mais les lactatations n'étaient pas terminées en mars 57 lorsque nous avons arrêté les examens.

Nous portons dans le tableau V et sur la figure 4 les résultats des examens organoleptiques des échantillons correspondant aux deux premiers et aux deux derniers mois de lactation. Il est facile de constater que le lait est moins bon pendant les deux derniers mois de la lactation (« bons laits », 39,2 p. 100) que pendant les deux premiers mois (« bons laits » 71,8 p. 100). Le défaut de rance est très souvent noté en fin de lactation. Les derniers échantillons sont parfois franchement mauvais. Par contre certains défauts de goût autres que le goût de rance se rencontrent davantage dans le lait produit pendant les deux premiers mois de la lactation.

Dans le calcul précédent nous ne tenons pas compte du fait que les deux premiers ou les deux derniers mois de lactation des vaches considérées peuvent se placer dans la période de stabulation comme dans la période de pâturage.

TABLEAU V. — *Influence du stade de lactation*

Proportions des "bons laits" et des laits présentant un défaut de goût ou une saveur salée, pendant les deux premiers et les deux derniers mois de lactation
(Lait cru)

Pendant les deux premiers mois de lactation

Nom des vaches et n°	Date de vêlage	Mode de vie pendant ces deux mois	Nombre d'échantillons examinés	« Bons laits »	Goût de rance	Autres défauts	Saveur salée
Baby 101 N	6–11–56	Stabulation	7	3	1	3	
Belladone 30 H	15–12–56	Stabulation	4	3		1	
Cabale 6 N	11– 3–56	Stab. + Pât.	9	9			
Cocarde 14 N	9– 2–56	Stabulation	7	3		4	
Églantine 18 H	24– 3–56	Stab. + Pât.	9	9			
Hortensia 22 H	31– 5–56	Pâturage	2	2			
Pastille 9 N	13– 2–56	Stabulation	8	7	1		
Pervenche 21 H	12– 3–56	Stab. + Pât.	10	7	2	1	
Pietje 23 H	3– 4–56	Stab. + Pât.	8	6		2	
Pivoine 8 H	24– 4–56	Pâturage	7	2	2	3	
Unité 26 H	28– 2–56	Stabulation	7	5		2	
			Total 78	total 56 soit 71,8 %	total 6 soit 7,7 %	total 16 soit 20,5 %	

Pendant les deux derniers mois de lactation

Nom des vaches et n°	Date de tarissement	Mode de vie pendant ces deux mois	Nombre d'échantillons examinés	« Bons laits »	Goût de rance	Autres défauts	Saveur salée
Actée 1 N	7– 5–56	Pâturage	7	6	1		*1*
Amande 6 P	23–11–56	Pât. + Stab.	4	3		1	*2*
Baby 101 N	5– 9–56	Pâturage	5	2	3		*1*
Belladone 30 H	8–10–56	Pâturage	8	5	3		
Cabale 6 N	7– 1–57	Stabulation	8	6	2		
Hortensia 22 H	15– 3–57	Stabulation	8	6		2	*3*
Laura 32 H	31– 1–57	Stabulation	7	1	4	2	
Pervenche 21 H	5– 3–57	Stabulation	8		8		
Pietje 23 H	24– 1–57	Stabulation	7	2	3	2	*2*
Pivoine 8 H	3– 3–57	Stabulation	8		6	2	*2*
Unité 26 H	6–12–56	Pât. + Stab.	9		9		
			total 79	total 31 soit 39,2 %	total 39 soit 49,4 %	total 9 soit 11,4 %	total *11* soit *13,9* %

Reprenons le calcul en tenant compte de cette remarque. Si les deux premiers mois de lactation sont situés dans la période de stabulation, nous trouvons que 64 p. 100 des échantillons examinés sont classés « bons laits », que 6 p. 100 présentent un goût de rance et que 30 p. 100 présentent d'autres défauts. Malheureusement nous disposons de trop peu de cas où les deux premiers mois de lactation sont situés en période de pâturage pour nous permettre d'effectuer ce même calcul.

Par contre nous pouvons comparer les résultats obtenus pour les deux derniers mois de lactation situés d'une part en période de stabulation

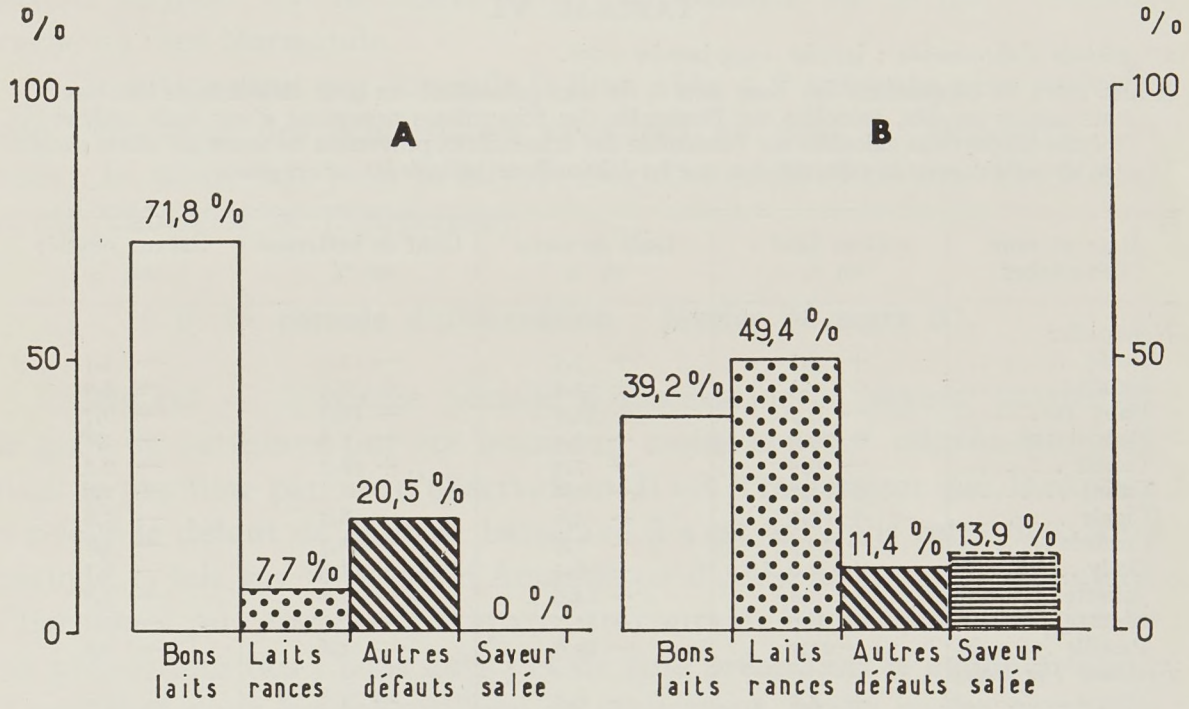


FIG. 4. — Influence du stade de lactation sur l'apparition des défauts de goût du lait.

Proportions de « bons laits » et de laits présentant un défaut de goût, au cours des deux premiers (A) et des deux derniers (B) mois de lactation. (La saveur salée n'est pas considérée comme un défaut.)

et d'autre part en période de pâturage. Nous trouvons en période de stabulation : 27,2 p. 100 des échantillons classés « bons laits », 58,0 p. 100 présentant un goût de rance et 14,8 p. 100 présentant d'autres défauts de goût. En période de pâturage les résultats sont les suivants : 65 p. 100 des échantillons examinés classés « bons » et 35 p. 100 présentant un goût de rance.

Nous confirmons donc les résultats portés dans le tableau IV.

Il existe une nette différence d'une vache à une autre en ce qui concerne l'apparition des défauts de goût en fin de lactation. Cette différence existe aussi, si l'on considère la période entière de lactation.

7. — Influence de l'individu.

a) 1re période d'observation : janvier 55 à janvier 56.

Pendant la première période d'observation nous avons rapproché les examens portant d'une part sur les échantillons de lait provenant d'une vache déterminée et portant d'autre part sur l'ensemble des échantillons de lait provenant des autres vaches ; tous ces échantillons étant prélevés les mêmes jours. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de la totalité des échantillons examinés de part et d'autre, et sont portés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

1re *période d'observation* : janvier 1955-janvier 1956.

Écarts entre les proportions de« bons laits », de laits présentant un goût de rance, de betterave ou une saveur oxydée, calculées sur l'ensemble des échantillons provenant *d'une seule vache* et ces mêmes proportions calculées sur l'ensemble des échantillons provenant de *toutes les autres vaches*. On ne retient pour la comparaison que les échantillons *prélevés les mêmes jours*.

Race et nom des vaches	« Bons laits » en %	Goût de rance en %	Goût de betterave en %	Saveur oxydée en %
Normande :				
Actée	+ 5,1	+ 7,5	— 11,3	— 4,7
Babou	+ 0,4	+ 2,4	+ 1,9	— 4,0
Baby 101	— 8,7	+ 31,7	— 10,3	— 0,7
Bandol 116	+ 19,9	— 0,1	— 7,6	— 4,1
Cabale	— 9,5	— 7,3	+ 16,7	— 0,2
Caline	+ 15,2	— 0,8		— 2,7
Cigale	+ 15,1	+ 4,6	— 8,2	— 5,8
Cocarde	+ 20,5	+ 1,9	— 10,7	— 3,1
Dolly	+ 3,0	+ 6,1	— 1,5	— 6,1
Joliette	— 6,4	+ 14,9	— 1,0	— 5,7
Linotte	+ 8,8	+ 1,5	— 7,9	— 1,1
Pastille	+ 22,2	— 12,6	— 1,6	— 0,8
Frisonne Pie Noire				
Borgia	+ 4,5	— 9,5	— 1,5	+ 10,8
Belladone	+ 11,0	+ 1,9	— 5,6	— 5,1
Begonia	+ 7,4	— 6,1	+ 8,0	— 1,1
Betty	+ 3,9	+ 6,1	— 8,2	— 1,1
Biscara	— 15,5	+ 15,4	— 0,3	+ 9,4
Églantine	+ 25,2	+ 0,2	— 3,6	— 10,1
Hortensia	+ 24,3	+ 0,9	— 2,9	+ 1,5
Laura	— 7,2	+ 0,6	— 6,9	+ 13,1
Libellule	+ 18,7	+ 0,5	— 13,4	+ 1,7
Pivoine	+ 14,5	+ 4,6	— 1,9	— 5,9
Pietje	— 21,0	+ 2,6	— 1,6	+ 7,7
Unité	+ 18,5	— 10,1	— 0,3	— 0,9
Pie Rouge de l'Est :				
Amande	— 17,6	— 13,6	+ 8,6	+ 7,2
Aïda	— 22,5	— 10,9	+ 11,3	+ 6,8

Le pourcentage de « bons laits » pour les vaches suivantes est nettement plus élevé que le pourcentage de « bons laits » relevé pour l'ensemble des autres vaches :

— Pastille 9 N, Cocarde 14 N, Bandol 116 N, de race Normande.

— Églantine 18 H, Hortensia 22 H, Libellule, Unité 26 H de race Frisonne Pie Noire.

Le pourcentage de « bons laits » est nettement inférieur au pourcentage relevé pour l'ensemble du troupeau, pour les vaches suivantes :

— Baby 101 N, Joliette 15 N, de race Normande.

— Biscara 29 H, Pietje 23 H, Laura 32 H de race Frisonne Pie Noire.

— Amande 6 P, Aïda 5 P, de race Pie Rouge de l'Est.

Les laits de Baby 101 N et Joliette 15 N, de race Normande, et celui de Biscara 29 H, de race Frisonne Pie Noire, présentent beaucoup plus souvent que l'ensemble des échantillons un goût de rance.

Les laits de Borgia 28 H, Biscara 29 H, Laura 32 H, Pietje 23 H de race Frisonne Pie Noire et ceux d'Amande 6 P et d'Aïda 5 P de race Pie Rouge de l'Est ont plus souvent que l'ensemble des échantillons une saveur oxydée ; on ne relève cette particularité sur le lait d'aucune vache de race Normande.

Le lait produit par Amande 6 P et Aïda 5 P présente plus souvent que l'ensemble des échantillons examinés un goût de betterave. On relève le même fait pour le lait de Bégonia 20 H (Frisonne Pie Noire) et de Cabale 6 N (Normande).

b) 2e période d'observation : février 56-mars 57.

Pendant la deuxième période d'observation la saveur oxydée et le goût de betterave ont été beaucoup moins souvent relevés que pendant la première période d'observation. Il est à remarquer que lorsqu'on a relevé le défaut de goût de betterave il s'est agi dans cette deuxième période, 4 fois sur 7 du lait d'Amande ou d'Aïda de race Pie Rouge de l'Est. On a pu cependant comparer au cours de cette deuxième période les proportions des « bons laits » et de laits présentant le goût de rance, d'une part pour les échantillons se rapportant à une vache examinée régulièrement et d'autre part pour l'ensemble des échantillons examinés pendant la même période. On obtient le tableau VII.

On constate que les proportions les plus élevées de « bons laits » se rencontrent pour les vaches suivantes : Pastille 9 N (race Normande), Hortensia 22 H, Belladone 30 H (race Frisonne Pie Noire). Les proportions les plus faibles pour les vaches suivantes : Cocarde 14 N, Baby 101 N (race Normande), Pervenche 21 H (race Frisonne Pie Noire).

Les laits provenant d'Unité 26 H, de Pervenche 21 H, de Pivoine 8 H, de Cocarde 14 N et de Baby 101 N présentent plus souvent que l'ensemble des échantillons un goût de rance. Par contre le lait produit par Amande 6 P et Hortensia 22 H ne présente jamais en 56-57 ce même défaut.

Le lait de Cocarde 14 N était considéré en 55-56 comme excellent ; il ne possédait plus cette qualité en 56-57. L'état de santé de Cocarde a été mauvais dès juillet 56.

Les différences que l'on observe entre les résultats se rapportant au lait d'une vache et ceux se rapportant à l'ensemble des échantillons aussi bien pour les pourcentages de bons laits, que pour la fréquence d'apparition des défauts de goût, sont toujours plus accentuées pour les laits crus que pour les laits pasteurisés.

TABLEAU VII

2e *période d'observation* : février 1956-mars 1957.

Proportions des échantillons de « bons laits » et des échantillons de lait présentant un goût de rance calculées d'une part, sur l'ensemble des échantillons provenant d'une seule vache et prélevés pendant une certaine période et calculées d'autre part, sur l'ensemble des échantillons de lait provenant de toutes les vaches et examinés pendant la même période (témoin).

Nom des vaches	Bons laits				Laits présentant un goût de rance			
	Lait cru		Lait pasteurisé		Lait cru		Lait pasteurisé	
	Individuel en %	Témoin en %	Individuel en %	Témoin en %	Individuel en %	Témoin en %	Individuel en %	Témoin en %
Amande 6 P	79,3	71,0	65,5	70,0	0	13,7	0	3,6
Baby 101 N	40,0	62,7	71,8	71,8	47,5	22,2	10,3	6,6
Belladone 30 H .	87,5	69,2	71,9	74,9	9,4	15,5	3,1	5,2
Cabale 6 N.....	86,5	64,1	73,0	67,9	8,1	19,2	0	6,0
Cocarde 14 N ...	51,5	68,2	57,5	68,0	30,3	16,1	15,1	4,5
Églantine 18 H ..	66,6	62,0	66,6	69,7	26,6	21,7	11,1	7,7
Hortensia 22 H..	72,7	57,4	81,2	68,8	0	26,4	0	10,1
Laura 32 H.....	51,2	62,9	64,3	68,0	18,6	20,9	4,7	5,8
Pastille 9 N	91,8	60,5	87,2	69,1	8,2	21,5	0	6,8
Pervenche 21 H .	28,8	62,1	62,8	68,1	60,0	21,7	15,4	7,4
Pietje 23 H.....	60,0	63,2	76,5	68,9	17,1	20,1	0	6,4
Pivoine 8 H	47,3	61,0	52,6	67,1	36,8	22,8	18,4	9,1
Unité 26 H	51,4	65,9	54,3	68,9	31,4	17,7	14,3	5,7

8. — Influence de la nourriture.

Depuis la rentrée à l'étable jusqu'à la mise à l'herbe la nourriture distribuée aux vaches laitières n'est pas uniforme. Elle est à base de foin, de betteraves, d'ensilage et de concentré (ce dernier étant distribué proportionnellement à la quantité de lait produit par chaque vache), mais les rations des trois premiers éléments varient au cours de l'hiver et varient également d'une vache à l'autre par suite des expériences d'alimentation poursuivies par la Station de Recherches sur l'Élevage.

D'autre part, pendant la période de pâturage, il arrive fréquemment que des aliments d'appoint soient distribués aux vaches laitières (pulpe de betteraves, fannes de carottes, choux, herbe coupée, luzerne en vert) lorsque l'herbe des prairies s'avère insuffisante.

Il est donc difficile d'établir une relation précise entre la nourriture distribuée aux vaches laitières et l'apparition des défauts de goût dans le lait. Seule une étude comportant des examens organoleptiques fréquents (journaliers par exemple) effectués sur le lait produit par différentes

vaches ayant vêlé à des dates voisines, et dont l'alimentation est exactement connue, peut permettre d'obtenir des résultats valables.

Notre étude nous permet cependant de remarquer que la répercussion de l'alimentation sur la qualité organoleptique du lait varie en fonction de l'individualité des vaches laitières. Ainsi le lait de Pastille (9 N) vache appartenant à la race Normande, semble particulièrement résistant à l'apparition des défauts de goût : malgré une consommation journalière réelle d'ensilage voisine de 15 à 20 kg tous les échantillons de lait examinés pendant la période correspondante se classent dans la catégorie des « bons laits » à l'exception d'un seul échantillon de lait présentant un « goût de rance ».

9. — Influence de l'état de santé de la vache laitière.

Nous avons noté, au cours de nos observations un goût de rance accentué et souvent un « mauvais goût » sur des échantillons de lait provenant de vaches dont l'état de santé n'était pas satisfaisant (Cocarde, Vinette, Pigeonne).

Nous avons noté à de nombreuses reprises que le lait provenant de vaches atteintes de mammite présentait une saveur salée.

Nous n'avons pas constaté qu'un traitement aux antibiotiques effectué en cas de mammite entraîne l'apparition de défaut de goût particulier dans le lait.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de l'expérimentation conduite à Jouy-en-Josas nous avons retrouvé les défauts de goût signalés dans le lait par les auteurs étrangers.

Nous noterons cependant que la saveur oxydée se rencontre moins fréquemment sur le lait pasteurisé en France, que dans les pays anglo-saxons. Ceci peut être lié au fait que la pasteurisation industrielle s'effectue chez nous, très souvent, à une température voisine de 90°C. Par contre le goût de cuit est un défaut à peu près général mais auquel le consommateur français est habitué puisque l'ébullition du lait reste une pratique courante dans de nombreux foyers.

Il nous a été possible, au cours de cette étude, de confirmer l'influence d'un certain nombre de facteurs déjà signalés par les auteurs étrangers. Mais il est certain que l'influence propre exercée par l'alimentation, le stade de lactation ou la race des vaches laitières est difficile à établir d'après les informations recueillies au cours de notre étude. En particulier nous ne pouvons pas conclure en ce qui concerne l'influence de l'alimentation sur l'apparition des défauts de goût dans le lait et il sera nécessaire que cette question fasse l'objet d'études ultérieures.

En ce qui concerne l'influence du stade de lactation nous pensons que la conclusion que nous donnons est valable : à savoir que le goût de rance

est un défaut caractéristique de la fin de lactation et que ce défaut est plus accentué lorsque les deux derniers mois de lactation se situent en période de stabulation. Nous ne pensons cependant pas que le fait pour les vaches laitières de rester à l'étable ou le fait de recevoir une alimentation d'hiver suffisent à provoquer l'apparition du goût de rance puisque lors des deux premiers mois de lactation même quand ils se situent en période de stabulation on ne relève que rarement le goût de rance sur les échantillons de lait examinés.

Nous avons relevé que la saveur oxydée semble apparaître davantage sur les échantillons de lait provenant de vaches en début de lactation. Nous avons noté aussi que le lait produit le matin était plus sensible à l'oxydation que le lait du soir. Peut-on en conclure qu'une relation existe entre la quantité de lait produit et la susceptibilité de ce lait au développement de la saveur oxydée?

Nous avons d'autre part noté au cours de notre étude que le lait produit par les vaches de race Normande présentait moins souvent que le lait produit par les vaches appartenant aux deux autres races (Frisonne Pie Noire et Pie Rouge de l'Est) le défaut de « saveur oxydée ». Ceci provient-il d'une plus faible production laitière des vaches de race Normande, qu'il faudrait démontrer, ou doit-on envisager l'action de substances dites « protectrices » vis-à-vis du développement de la saveur oxydée? Nous savons en effet que le lait produit par les vaches de race Normande est toujours plus coloré que le lait produit par les vaches de race Frisonne Pie Noire ou Pie Rouge de l'Est, du moins en période de stabulation, seule période pendant laquelle le lait présente une « saveur oxydée ». Cette question de l'influence de la coloration de la matière grasse du lait sur la susceptibilité de ce dernier à l'oxydation a été plusieurs fois évoquée par les auteurs. Il est possible que l'adjonction de carotène à la ration alimentaire d'hiver des vaches laitières soit à retenir.

Produire un lait dont la qualité organoleptique soit sans cesse améliorée, doit rester le souci primordial de l'éleveur. Pour obtenir ce résultat, les plus grands soins doivent être apportés à la surveillance sanitaire des vaches laitières, à leur « confort », au choix de leur alimentation. Il se peut cependant que malgré ces précautions la qualité organoleptique de certains laits reste mauvaise. L'éleveur devrait alors éviter l'incorporation de tels laits au lait destiné à la consommation.

Reçu pour publication le 13 *novembre* 1959.

Nous remercions la Station de Recherches sur l'Élevage, qui a mis à notre disposition les renseignements de tous ordres concernant l'ensemble du troupeau examiné.

Nous remercions également Messieurs FAUCONNEAU et DUPIN, qui ont bien voulu nous prêter leur concours lors des examens organoleptiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Mocquot (G.). — Aspects techniques et hygiéniques du problème des laits destinés à la consommation. *Ann. Nut. Al.*, IX, n° 4, 1955.

(2) Herrington (B. L.). — The control of rancidity in milk. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1613, 1956.

(3) Brown (W. C.) et Thurston (L. M.). — A review of oxidation in milk and milk products as related to flavor. *J. Dairy Sci.*, **23**, 629, 1940.

(4) Greenbank (G. R.). — The oxidized flavor in milk and dairy products : a review. *J. Dairy Sci.*, **31**, 913, 1948.

(5) Kruisheer (C. I.). — Defects in flavor of liquid milk caused by oxidative processes. *Neth. Milk. Dairy J.*, **6**, 242, 1952.

(6) Lea (C. H.). — Oxidation defects of milk and dairy products. *XIII*e *Congrès International de Laiterie*, La Haye, 1953, vol. 3, Sect. 4, 1037.

(7) Riel (R. R.) et Sommer (H. H.). — Oxidized flavor in milk. 1. Review literature. *Institut d'OKA, éditeur. La Trappe*, P. Q., Canada, 1954.

(8) Stull (J. W.). — The effect of light on activated flavor development and on the constituents of milk and its products : a review. *J. Dairy Sci.*, **36**, 1153, 1953.

(9) Patton (S.). — Browning and associated changes in milk and its products : a review. *J. Dairy Sci.*, **38**, 457, 1955.

(10) Roland (C. T.), Sorensen (C. M.) et Whitaker (R.). — A study of oxidized flavor in commercial pasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, **20**, 213, 1937.

(11) Roadhouse (C. L.) et Henderson (J. L.). — Flavors of milk and their control. *University of California*, Bulletin 595, 1935.

(12) Aule (O.) et Storgards (T.). — The resistance of milk to the development of oxidized flavour, as influenced by season. *XIII*e *Congrès international de laiterie*, La Haye, 1953, Sect. IV, sujet 2, p. 1076.

(13) Chilson (W. H.), Martin (W. H.) et Parrish (D. B.). — The relationship of ascorbic acid to the development of oxidized flavor in market milk. *J. Dairy Sci.*, **32**, 306, 1949.

(14) Trout (G. M.) et Jessing (C. G.). — Ascorbic acid and oxidized flavor in milk. I. Distribution of ascorbic acid and occurrence of oxidized flavor in commercial graded A raw, in pasteurized irradiated, and in pasteurized milk throughout the year. *J. Dairy Sci.*, **22**, 271, 1939.

(15) Nelson (J. A.) et Trout (G. M.). — Judging and grading milk. Olsen Publis. Co Milwaukee 12, Wis., 1951.

(16) Krukowsky (W.) et Loosli (J. K.). — Further studies on the influence of tocopherol supplementation on the vitamin content of the milk fat, stability of milk and milk and fat production. *J. Dairy Sci.*, **35**, 834, 1952.

(17) Weinstein (B. R.) et Trout (G. M.). — Susceptibility of milk from various dairy breeds to homogenization induced rancidity. *Milch. Agric. Exp. Sta. Quart. Bull.*, **32**, 311, 1950.

(18) Hvidstenh (H.), Mehlum (J. V.) et Simonsen. — Influence of feed on oxidized flavour development in milk. I. Feeding cod liver oil and herring meal. *Meieri posten, 41*, (9) 145-151 ; (10) 170-173 ; (11) 186-190. II. Effects of feeding large quantities of hay and silage and the effect of pasture. *Meieri posten 41* (14), 241-245, (15) 265-263, 1952. (ou D. S. A. 1952 p. 554).

(19) Weinstein (B. R.) et Trout (G. M.). — The solar activated flavor of homogenized milk. I. Susceptibility of individual cow's milk. *J. Dairy Sci.*, **34**, 554, 1951.

(20) Dunkley (W. L.). — Hydrolytic rancidity in milk. I. Surface tension and fat acidity as measures of rancidity. *J. Dairy Sci.*, **34**, 515, 1951.

(21) FRESDEEN (H.), BOWSTEAD (J. E.), DUNKLEY (W. L.) et SMITH (L. M.). — Hydrolytic rancidity in milk. II. Some managements and environmental factors influencing lipolysis. *J. Dairy Sci.*, **34**, 521, 1951.
(22) THOMAS (W. R.), HARPER (W. J.) et GOULD (I. A.). — Lipase activity in fresh milk as related to portions of milk drawn and fat globule size. *J. Dairy Sci.*, **38**, 315, 1955.
(23) BROWN (W. C.), THURSTON (L. M.) et DUSTMAN (R. B.). — Oxidized flavor in milk. IV. Studies of the relation of the feed of the cow to oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **20**, 133, 1937.
(24) STEBNITZ et SOMMER (H. H.). — The oxidation of butterfat. II. The composition of the fat in the relation to its susceptibility toward oxidation. *J. Dairy Sci.*, **20**, 265, 1937.
(25) KÄGI (F.). — Undesirable odours and flavours in milk. *Mitt. Lebensm. Hyg.* Bern, **41**, 65, 1950.
(26) TRACY (P. H.) et RUEHE (H. A.). — The relation of certain plant processes to flavor development in market milk. *J. Dairy Sci.*, **14**, 250, 1931.
(27) HONORE (R.) et HVIDSTEN (H.). — Influence of feed on oxidized flavor development in milk. III. Addition of copper to the feed. *Meieriposten*, **41** (17) 309-313, 1952.
(28) EPPLE (W. G.) et HORALL (B. E.). — The relation of copper and ascorbic acid to oxidized flavor in market milk. *J. Dairy Sci.*, **26**, 525, 1943.
(29) DE VLEESCHAUWER (A.), HENDRICK (H.) et WALLEZ (E.). — Contribution à l'étude sur le goût d'oxydation du lait. *XIII*e *Congrès International de laiterie*, La Haye, 1953, Sect. IV, sujet 2, p. 1072.
(30) THURSTON (L. M.), BROWN (W. C.) et DUSTMAN (R. B.). — Oxidized flavor in milk. II. The effects of homogenization, agitation and freezing of milk on its subsequent susceptibility to oxidized flavor development. *J. Dairy Sci.*, **19**, 671, 1936.
(31) KRUKOWSKY (V. N.) et SHARP (P. F.). — Effect of shaking on the lipolysis of cow's milk. *J. Dairy Sci.*, **21**, 671, 1938.
(32) HERRINGTON (B. L.). — Lipase : a review. *J. Dairy Sci.*, **37**, 775, 1954.
(33) KRUKOWSKY (V. N.) et HERRINGTON (B. L.). — Studies on the lipase action. II. The activation of milk lipase by temperature changes. *J. Dairy Sci*, **22**, 137, 1939.
(34) NELSON (D. H.) and DAHLE (C. D.). — The relation of iodine and peroxyde numbers to oxidized flavor of milk. *J. Dairy Sci.*, **23**, 391, 1940.
(35) ROADHOUSE (C. L.) and KOESTLER (G. A.). — Contribution to the knowledge of the taste of milk. *J. Dairy Sci.*, **12**, 421, 1929.
(36 *a*) PATTON (S.), FORSS (D. A.) et DAY (E. A.). — Methylsulfide and the flavor of milk. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1469, 1956.
(36 *b*) KOSIKOWSKI (F. V.). — Free volatile fatty acids in homogenized raw milk. *Int. Dairy Cong. 3*, 1545, Londres 1959.
(37) MAJER (G.). — *Molkerei Ztng. Hildesh.*, **45**, 1931.
(38) JENSEN (R. G.) et MORGAN (M. E.). — Detection of 1. monoglycerides in the fat from rancid milk. *J. Dairy Sci.*, **40**, 1199, 1957.
(39) KRUKOWSKY (V. N.) et HERRINGTON (B. L.). — Studies on lipase action. VI. The effect of lipolysis upon the flavor score of milk. *J. Dairy Sci.*, **25**, 235, 1942.
(40) TARASSUK (N. P.) et SMITH (F. R.). — Studies on rancid milk. Relation of surface tension of rancid milk to its acid coagulation. *J. Dairy Sci.*, **22**, 415, 1939.
(41) PROKS (J.) et GROH (J.). — Le goût défectueux du lait. *Le lait*, **15**, 370, 1935.
(42) HERRINGTON (B. L.) et KRUKOWSKY (V. N.). — Studies of lipase. I. Lipase action in normal milk. *J. Dairy Sci.*, **22**, 127, 1939.
(43) ECKLE (C. H.) et SHAW (R. H.). — The influence of the stage of lactation on the composition and properties of milk. *Bureau of Anim. husb.*, 1913, bull. 155.

(44) Hlynka (I.) et Hood (E. G.). — Milk lipase and milk flavor. *J. Dairy Sci.*, **25**, 389, 1942.
(45) Kelly (P. L.). — The lipolytic activity of bovine mammary gland tissue. *J. Dairy Sci.*, **26**, 385, 1943.
(46) Krukowsky (V. N.) et Herrington (B. L.). — Studies on lipase action. VII. The influence of the rate of cooling upon the subsequent rate of lipolysis in milk stored at low temperature. *J. Dairy Sci.*, **25**, 241, 1942.
(47) Tarassuk (N. P.) et Jack. — Lipolytic flavors of milk. *Milk plant monthly*, **38**, 48, 1949.
(48) Tarassuk (N. P.) et Frankel (E. N.). — On the mechanism of activation of lipolysis and the stability of lipase systems of normal milk. *J. Dairy Sci.*, **38**, 438, 1955.
(49) Rohan (D. C.) et Sommer (H. H.). — Lipolytic activity in milk and cream. *J. Dairy Sci.*, **23**, 831, 1940.
(50) Gould (I. A.). — Influence of pH, type of fat and pancreatic extract upon hydrolysis in homogenized milk. *J. Dairy Sci.*, **24**, 779, 1941.
(51) Mattick (E. C. V.) et Kay (H. D.). — A lipase (tributyrinase) of cow's milk. Occurrence, method of estimating and relation to lactation cycle. *J. Dairy Res.*, **9**, 58, 1938.
(52) Peterson (M. H.), Johnson (H. J.) et Price (W. V.). — Determination of milk lipase. *J. Dairy Sci.*, **26**, 233, 1943.
(53) Albrecht (T. W.) et Jaynes (H. O.). — Milk lipase. *J. Dairy Sci.*, **38**, 137, 1955.
(54) Kelly (P. L.). — Milk lipase activity, a method for its determination and its relation to the Estrus cycle. *J. Dairy Sci.*, **28**, 803, 1945.
(55) Kelly (P. L.). — The determination of lipase from milk extracted with acetone and ether. *J. Dairy Sci.*, **27**, 675, 1944.
(56) Schwartz (D. P.), Gould (I. A.) et Harper (W. J.). — The milk lipase system. II. Effect of formaldehyde. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1375, 1956.
(57) Roland (C. T.) et Trebler (H. A.). — The effect of fat content on oxidized flavor in milk and cream. *J. Dairy Sci.*, **20**, 345, 1957.
(58) Pont (E. G.). — Studies on the origin of oxidized flavour in whole milk. *J. Dairy Res.*, **19**, 316, 1952.
(59) Keeney (M.) et Dvan (F. J.). — Studies on oxidized milk fat. *J. Dairy Sci.*, **34**, 713, 1951.
(60) Holm (U.), Wode (G.) et Thome (K. E.). — Oily flavour in butter and α, β, unsaturated carbonyl compounds. Medd. Statens Mejeriforsök n° 37, 1952.
(61) Thome (K. E.) et Mattsson. (S.) — Investigations into the oxidation defects in butter. *XIIIe Congrès Intern. Laiterie*, La Haye, 1953, **3**, Sect. IV, 1056.
(62) Forss (D. A.), Pont (E. G.) et Stark (W.). — The volatile compounds associated with oxidized flavor in skim milk. *J. Dairy Res.*, **22**, 91, 1955.
(63) Forss (D. A.), Pont (E. G.) et Stark (W.). — Further observations on the volatile compounds associated with oxidized flavor in *skim* milk. *J. Dairy Res.*, **22**, 345, 1955.
(64) Kende (S.). — Untersuchungen über « ölig », « talgige », « schmirgelige » Verauderungen der Milch. *Milchw. Forsch.*, **13**, 111, 1932.
(65) Dahle (C. D.) et Palmer (L. S.). — The oxidized flavor in milk from the individual cow. *Penna Agric. Exp. Sta. Bull.*, **347**, 1937.
(66) Brown (W. C.), Dustman (R. B.) et Thurston (L. M.). — Oxidized flavor in milk. V. The effect of metal developed oxidized flavor on the iodine number of the milk fat. *J. Dairy Sci.*, **17**, 321, 1934.

(67) HENDERSON (J. L.) et ROADHOUSE (C. L.). — Factors influencing the initial induction period in the oxidation of milk fat. *J. Dairy Sci.*, **17**, 321, 1934.
(68) HOLM (G. E.) et GREENBANK (G. R.). — Quantitative aspects of the Kreis test. *Industr. Engin. Chem.*, **15**, 1051, 1923.
(69) HORALL (B. E.). — A study of the lecithin content of milk and its products. *Ind. Agr. Exp. Sta. Bull.*, **401**, 1935.
(70) THURSTON (L. M.), BROWN (W. C.) et DUSTMAN (R. B.). — Oxidized flavor in milk. I. The probable relation of lecithin to oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **18**, 301, 1935.
(71) SWANSON (A. M.) et SOMMER (H. H.). — Oxidized flavor in milk. I. Effect of the development of oxidized on the iodine number of the phospholipid fraction of milk. *J. Dairy Sci.*, **23**, 201, 1940.
(72) HIETARANTA (M.). — The oxidation reduction potential in butter and the oxidation of butterfat. Suomen Kemistilehti, 19 B, 125, 1946. *Chem. Abst.*, **41**, 5227, 1947.
(73) RIEL (R. R.) et SOMMER (H. H.). — Isolation and characterization of some oxidation products associated with oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **38**, 1215, 1955.
(74) BECK (G. H.), WHITNAH (C. H.) et MARTIN (W. H.). — Relation of vitamin C, lecithin and carotene of milk to the development of oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **22**, 17, 1939.
(75) GOULD (I. A.), FOX (W. K.) et TROUT (G. M.). — Influence of feeds on lecithin content to susceptibility of milk to copper induced oxidized flavor. *Food Res.*, **5**, 131, 1940.
(76) GUTHRIE (E. S.). — Development of oxidized flavors in unhomogenized milk and homogenized milk. *J. Dairy Sci.*, **38**, 595, 1955.
(77) BROWN (W. C.), THURSTON (L. M.) et DUSTMAN (R. B.). — Oxidized flavor in milk. IV. Studies of the relation of the feed of the cow to oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **20**, 133, 1937.
(78) BROWN (W. C.), VANLANDINGHAM (A. H.) et WEAKLEY (C. E.). — Oxidized flavor in milk. VII. Studies of the effect of carotene and ascorbic acid in the feed of the cow on the susceptibility of the milk to metal induced oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **22**, 345, 1939.
(79) SHARP (P. F.), TROUT (G. M.) et GUTHRIE (E. S.). — Vitamin C, copper and the oxidized flavor of milk. *Milk plant Monthly*, **24**, 32, 1937.
(80) BECK (G. H.), WHITNAH (C. H.) et MARTIN (W. H.). — Relation of vitamin C, lecithin and carotene of milk to the development of oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **22**, 17, 1939.
(81) TROUT (C. M.) et JESSING (C. G.). — Ascorbic acid and oxidized flavor in milk. I. Distribution of ascorbic acid and occurrence of oxidized flavor in commercial grade A raw, in pasteurized irradiated, and in pasteurized milk throughout the year. *J. Dairy Sci.*, **22**, 1939.
(82) KRUKOWSKY (V. N.) et GUTHRIE (E. S.). — Ascorbic acid oxidation a key factor in the inhibition or promotion of the tallowy flavor in milk. *J. Dairy Sci.*, **28**, 565, 1945.
(83) CHILSON (W. H.), MARTIN (W. H.) et PARRISH (D. B.). — The relationship of ascorbic acid to the development of oxidized flavor in market milk. *J. Dairy Sci.*, **32**, 306, 1949.
(84) OLSON (F. C.) et BROWN (W. C.). — Oxidized flavor in milk. XI. Ascorbic acid, glutathion and hydrogen peroxide as mechanisms for the production of oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **25**, 1027, 1942.
(85) ANDERSON (J. A.). — Off flavors milk. A problem of animal nutrition. *The milk dealer*, **26**, 60, 62, 64, 66, octobre 1936.
(86) KRUKOWSKY (V. N.) et LOOSLI (J. K.). — Further studies on the influence of tocopherol supplementation on the vitamin content of the milk fat, stability of milks and milk and fat production. *J. Dairy Sci.*, **35**, 834, 1952.

(87) Werb (R. E.) et Hileman (J. L.). — The relation of the oxidation reduction potential of milk to oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **20**, 47, 1937.
(88) Davies (W. L.). — The action of strong sunlight on milk (certified milk). *Certified milk*, **6**, 4, 1931.
(89) Tracy (P. H.) et Ruehe (H. A.). — The relation of certain plant processes to flavor development in market milk. *J. Dairy Sci.*, **14**, 250, 1931.
(90) McDowall (F. H.), McDowell (A. K. R.), Clemon (N. J.) et Bell (M. E.). — The effect of sunlight on the nutritional properties and flavour of milk in glass bottles. *The Dairy Research Institute* (N. Z.) Septembre 1948, Publication nº 211.
(91) Weinstein (B. R.) et Trout (G. M.). — The solar activated flavor of homogenized milk. I. Susceptibility of individual cow's milk. *J. Dairy Sci.*, **34**, 554, 1951.
(92) Weinstein (B. R.) et Trout (G. M.). — II. The role of oxidation and the effectiveness of certain treatments. *J. Dairy Sci.*, **34**, 559, 1951.
(93) Flake (J. C.), Jackson (H. C.) et Weckel (K. G.). — Studies on the activated flavor of milk. Paper presented at the 33rd Ann. Meet. A. J. D. S. 1938.
(94) Weinstein (B. R.) et Trout (G. M.). — III. Effect of deaeration, surface area of fat globules and relation of the Kreis test. *J. Dairy Sci.*, **34**, 565, 1951.
(95) Weinstein (B. R.), Duncan (C. W.) et Trout (G. M.). — IV. Isolation and characterization of a whey constituent capable of producing the solar-activated flavor. *J. Dairy Sci.*, **34**, 570, 1951.
(96) Herreid (E. O.), Ruskin (B.), Clark (G. L.) et Parks (T. B.). — Ascorbic acid and riboflavin destruction and flavor development in milk exposed to the sun in Amber, clear, paper and ruby bottles. *J. Dairy Sci.*, **35**, 772, 1952.
(97) Hutton (J. T.) et Patton (S.). — The origin of sulphydryl groups in milk protein and their contribution to cooked flavor. *J. Dairy Sci.*, **35**, 699, 1952.
(98) Patton (S.). — The mechanism of sunlight flavor formation in milk with special reference to methionine and riboflavine. *J. Dairy Sci.*, **37**, 446, 1954.
(99) Jackson (C. J.). — Note on the sulphydryl compounds of milk. *J. Dairy Res.*, **7**, 29, 1936.
(100) Josephson (D. V.) et Doan (F. J.). — Observations on cooked flavor in milk : its source and significance. *Milk dealer*, **29**, 35, 1939.
(101) Patton (S.) et Josephson (D. V.). — Observations on the application of the nitroprussite test to heated milk. *J. Dairy Sci.*, **32**, 398, 1949.
(102) Townley (R. C.), et Gould (I. A.). — A quantitative study of heat labile sulfides of milk. I. A method of determination and the influence of temperature and time. *J. Dairy Sci.*, **26**, 689, 1943.
(103) Gould (I. A.). — Compounds formed by heat treatment of milk. *Milk plant monthly*, **40**, 44, 1951.
(104) Gould (I. A. Jr) and Sommer (H. H.). — Effect of heat on milk with special references to the cooked flavor. *Mich. Agri. Exp. Sta. Tech. Bull.*, **164**, 1939.
(105) Mattick (A. T. R.). — *J. Agr. Sci.*, **17**, 388, 1924.
(106) Pont (E. G.). — Seasonal variation in the susceptibility of market milk to oxidized flavour. *Aust. J. Dairy Techn.*, **13**, 146, 1958.
(107) McDowell (A. K. R.) et McDowall (F. H.). — The vitamin A potency of New Zealand butter. *J. Dairy Res.*, **20**, 76, 1953.
(108) François (A.). — Recherche sur le comportement biochimique et physiologique de la vitamine A dans la sécrétion lactée. *Thèse Fac. Sci.*, Paris 1948.

(109) SCHWARZ (G.), LUDWIG (J.) et GIESSLER (E. M.). — Eigenschaften und Zusammensetzung von Kuhmilch in Baden Würtemberg. *Milchw. Forsch. Kiel*, Heft 3, 1957.

(110) GUTHRIE (E. S.) et BRUECKNER. — *Cornell Agr. Exp. Sta. Bull.*, **606**, 10, 1933.

(111) KRUKOWSKY (V. N.), WHITING (F.) et LOOSLI (J. K.). — Tocophenol, carotenoid and vitamin A content of the milk fat and the resistance of milk to the development of oxidized flavors as influenced by breed and season. *J. Dairy Sci.*, **33**, 791, 1950.

(112) HERRINGTON (B. L.) et KRUKOWSKY (V. N.). — Studies on lipase action. III. Lipase action in the milk of individual cows *J. Dairy Sci.*, **22**, 149, 1939.

(113) HILEMAN (J. L.) et COURTNEY (F.). — Seasonal variations in the lipase content of milk. *J. Dairy Sci.*, **18**, 247, 1935.

(114) TARASSUK (N. P.) et REGAN (W. M.). — A study of the blood carotene in relation to lipolytic activity of milk. *J. Dairy Sci.*, **26**, 987, 1943.

(115) FREEDEN (H.), BOWSTEHD (J. E.), DUNKLEY (W. L.) et SMITH (L. M.). — Hydrolytic rancidity in milk. II. Some management and environmental factors influencing lipolysis. *J. Dairy Sci.*, **34**, 521, 1951.

(116) RASMUSSEN (R.), GUERRANT (N. B.), SHAW (A. O.), WELLK (R. C.) et BECKDEL (S. L.). — *J. Nutrition*, **11**, 425, 1936.

(117) CORBETT (W. J.) et TRACY (P. H.). — The incidence of oxidized flavor in the milk individual cows within one herd. *J. Dairy Sci.*, **26**, 1095, 1943.

(118) BRUEKNER et GUTHRIE (E. S.). — Proc. Intern. Assoc. milk dealers. Lab. Sec. 3-16, 1934.

(119) KING (R. L.) et DUNKLEY (W. L.). — Relation of natural copper in milk to incidence of spontaneous oxidized flavor. *J. Dairy Sci.*, **42**, 420, 1959.

ESSAI D'OBTENTION ET DE DÉGUSTATION DE JUS DE RAISIN A PARTIR D'HYBRIDES-PRODUCTEURS

PAR

P. HUGLIN et J. SCHWARTZ

Station de Recherches viticoles et œnologiques, Colmar.

PLAN DU MÉMOIRE

I — Introduction.

II. — Choix et aptitudes culturales des variétés.

III. — Préparation des jus.

IV. — Analyse des jus.

V. — Dégustation des jus.

A. — Méthode utilisée.
B. — Choix de dégustateurs valables.
C. — Résultats de la dégustation.

VI. — Conclusion.

VII. — Bibliographie.

I. — Introduction.

Alors que les problèmes posés par la technologie des jus de raisin paraissent avoir reçu des solutions pour le moins satisfaisantes, il ne semble pas qu'il en soit toujours de même en ce qui concerne le choix de la matière première.

La dégustation de jus de raisin du commerce, provenant principalement de maisons établies dans le nord-est de notre pays, nous a en effet montré que ces derniers étaient en général très bien préparés mais que leur valeur gustative laissait souvent à désirer, par suite de l'utilisation de variétés peu intéressantes pour cette spéculation.

Dans une région de vins à appellation contrôlée comme l'Alsace, il

est vrai que l'industrie naissante du jus de raisin ne dispose pas d'un choix très considérable de variétés (les cépages d'appellation constituent un produit trop cher pour cette production) de sorte qu'elle doit se rabattre sur une gamme assez étendue d'hybrides-producteurs provenant en majeure partie de zones de polyculture et sur quelques viniferas exclus de l'appellation.

Compte tenu de ces constatations nous avons pensé qu'il pourrait être utile de procéder à l'examen de certains hybrides producteurs en vue de leur utilisation pour l'obtention de jus de raisin. Les raisons suivantes ont d'ailleurs déterminé le choix d'hybrides producteurs pour cette expérimentation :

1. — Il est un fait connu que certains hybrides donnent des vins médiocres mais des jus très convenables.

2. — La diminution ou l'élimination des traitements anti-mildiou ainsi que la suppression du lavage des raisins qui en résulte réduit le prix de revient de la matière première.

3. — En cas de développement important de cette industrie, des plantations d'hybrides destinées à la fabrication de jus de raisin pourraient être établies en dehors de l'aire d'appellation contrôlée, excluant ainsi des risques de confusion.

II. — Choix et aptitudes culturales des variétés.

La matière première ayant servi à cet essai provient de la collection ampélographique du domaine de Bergheim (Haut-Rhin), vignoble à sol argilo-calcaire situé à une altitude de 270-310 mètres et jouissant d'une exposition sud. Il s'agit d'une bonne situation viticole.

Comme nous n'avions ni la possibilité, ni le désir de tester l'aptitude à la production de jus de tous les hybrides-producteurs disponibles nous nous sommes attachés en premier lieu à effectuer un tri tenant compte de certaines aptitudes culturales intéressantes pour des raisins à jus.

Dans une note relative aux caractéristiques des différents types de raisins, M. Flanzy (1) définit ainsi le raisin à jus : « fruit de la vigne caractérisé par un haut rendement en jus qui, sans concentration ou dilution, est consommé directement ou sert de base à des mélanges de jus ».

En conséquence, notre premier critère de sélection a été le rendement en jus des variétés, rendement qui aura intérêt à être le plus haut possible et qui, à notre avis, ne devrait pas descendre au-dessous de l'ordre de 80 hectolitres à l'hectare. On pourra d'ailleurs se rendre compte dans le tableau I que les rendements de la grande majorité des hybrides expérimentés ont largement dépassé ce minimum au cours des années 1957, 1958 et 1959.

En dehors de ce facteur, le même tableau comprend des indications sur d'autres caractéristiques qui ont également guidé notre choix :

— les époques de maturité d'après nos observations personnelles (ces époques ne coïncident pas toujours avec celles indiquées par PULLIAT (3) ;

— la résistance pratique au mildiou dans les conditions du nord-est de la France, où, en année normale la plupart de ces variétés ne nécessitent au maximum qu'un à deux traitements. Il va sans dire que ces données ne sont plus valables pour des régions où le mildiou sévit avec plus de violence ;

— le pourcentage de bourgeons primaires détruits par les gelées hivernales de février 1956, en tant qu'indication de la résistance au froid de ces hybrides.

TABLEAU I

Données culturales des hybrides-producteurs expérimentés.

Variétés	Couleur	Époque de maturité	Résistance pratique au Mildiou	% de bourgeons détruits par le froid en 1956	Rendement 1957 (hl/ha)	Rendement 1958 (hl/ha)	Rendement 1959 (hl/ha)
191-1 Kuhlmann ..	noir	1e précoce.	assez-bonne	20,0	77,9	91,2	83,7
252-1 Kuhlmann ..	noir	1e précoce.	assez-bonne	12,6	27,3	64,4	36,7
4643 Seibel	noir	1e tardive.	assez-bonne	/	130,4	147,9	86,3
5409 Seibel	blanc	1e moyenne	bonne	30,2	65,2	102,8	77,7
4986 Seibel	blanc	1e moyenne	bonne	32,4	76,3	83,5	94,4
9110 Seibel	blanc	1e moyenne	médiocre	34,3	134,0	87,6	176,5
14596 Seibel	blanc	1e tardive.	assez-bonne	/	41,0	228,9	199,3
14664 Seibel	blanc	1e tardive.	assez-bonne	57,5	134,5	69,8	180,9
5276 Seyve-Villard	blanc	1e moyenne	assez-bonne	/	147,4	90,4	80,0
14287 Seyve-Villard	blanc	1e moyenne	médiocre	37,1	71,8	108,5	83,5
22 A Baco	blanc	1e tardive.	passable	17,0	83,0	172,2	110,7
3 Rudelin.....	blanc	1e tardive.	assez-bonne	47,4	146,0	59,6	130,7
244 Landot	noir	1e moyenne	passable	18,0	84,6	90,7	57,8
2282 Landot	blanc	1e moyenne	mauvaise	48,0	121,3	76,1	55,9
426 Chambeaudière.	blanc	2e précoce.	médiocre	45,0	138,0	106,5	94,1

Dans les tableaux II et III on trouvera enfin le déroulement de la maturation au cours des années 1958 et 1959. Les conditions climatiques de ces deux années ont été très différentes. Alors que l'été 1958 s'est caractérisé par des températures inférieures et une pluviosité supérieure à la moyenne, le contraire s'est produit en 1959, ce qui explique le décalage de maturité d'environ 1 mois entre les deux années. A ce sujet il importe cependant de signaler dès à présent que les possibilités thermiques du milieu considéré sont largement excédentaires pour l'obtention des raisins à jus à partir de variétés de première époque et même de deuxième époque précoce. De ce fait on peut affirmer sans crainte d'erreur que des situations nettement moins favorables que celle-ci sont encore susceptibles de convenir pour cette production particulière.

TABLEAU II. — *Maturation des hybrides expérimentés Bergheim 1958*

Variétés	Prélèvement du 16. 9. 1958			Prélèvement du 30. 9. 1958			Prélèvement du 30. 10. 1958		
	Sucres gr/l.	Acidité g. SO_4H_2 par l.	Sucres / Acidité	Sucres gr/l.	Acidité g. SO_4H_2 par l.	Sucres / Acidité	Sucres gr/l	Acidité g. SO_4H_2 par l.	Sucres / Acidité
191-1 Kuhlmann	197	7,6	26,0	218	7,1	30,7	220	6,3	34,9
252-1 Kuhlmann	179	8,8	20,3	228	7,9	28,9	247	7,8	31,7
4 643 Seibel	127	12,4	10,3	172	9,3	18,5	180	8,5	21,0
5 409 Seibel	140	8,2	17,0	154	7,7	20,0	170	6,7	25,2
4 986 Seibel	155	9,9	15,7	163	9,2	17,7	174	7,7	22,6
9 110 Seibel	164	7,3	22,5	191	6,4	29,8	228	6,4	35,5
14 596 Seibel	121	9,2	13,1	151	7,7	19,6	164	6,4	25,6
14 664 Seibel	140	7,2	19,5	162	6,8	23,8	175	6,6	26,5
5 276 Seyve-Villard	134	8,8	15,2	159	6,7	23,7	199	6,2	32,0
14 287 Seyve-Villard	134	9,3	14,4	164	6,6	24,8	194	6,4	30,3
22 A Baco	82	15,5	5,3	138	12,3	11,2	202	8,5	23,8
3 Rudelin	115	10,7	10,7	159	8,7	18,3	189	8,4	22,5
244 Landot	142	7,8	18,2	183	7,4	24,7	220	7,5	29,4
2 282 Landot	127	10,0	12,7	167	7,6	21,9	193	6,8	28,7
426 Chambeaudière	100	9,6	10,4	102	8,9	11,7	138	8,0	17,2

TABLEAU III. — *Maturation des hybrides expérimentés 1959*

Variétés	Prélèvement du 28. 8. 1959			Prélèvement du 10. 9. 1959			Prélèvement du 25. 9. 1959		
	Sucres gr/l.	Acidité g. SO_4H_2 par l.	Sucres / Acidité	Sucres gr/l.	Acidité g. SO_4H_2 par l.	Sucres / Acidité	Sucres gr/l.	Acidité g. SO_4H_2 par l.	Sucres / Acidité
191-1 Kuhlmann	194	7,4	26,2	239	6,2	38,5	/	/	/
252-1 Kuhlmann	187	9,4	19,9	245	8,8	27,8	/	/	/
4 643 Seibel	138	12,5	11,0	187	10,0	18,7	231	8,4	27,5
5 409 Seibel	117	8,5	13,7	175	6,6	26,5	199	5,9	33,7
4 986 Seibel	136	12,5	10,8	195	8,2	23,8	238	7,2	33,1
9 110 Seibel	115	8,6	13,4	162	6,5	24,9	176	5,1	34,5
14 596 Seibel	105	10,9	9,6	156	9,1	17,1	/	/	/
14 664 Seibel	92	9,6	9,6	143	8,6	16,6	155	7,0	22,2
5 276 Seyve-Villard	127	8,7	14,6	189	5,7	33,1	/	/	/
14 287 Seyve-Villard	159	8,7	18,3	206	7,2	28,6	/	/	/
22 A Baco	45	22,0	2,0	114	17,5	6,5	176	8,3	21,2
3 Rudelin	87	13,5	6,4	149	8,8	16,9	163	8,2	19,8
244 Landot	162	7,7	21,0	209	6,5	32,1	/	/	/
2 282 Landot	127	8,8	14,4	165	6,9	23,9	185	6,5	28,5
426 Chambeaudière	110	9,0	12,2	162	7,2	22,5	175	6,6	26,5

III. — Préparation des jus.

Les jus d'hybrides servant à la présente expérimentation provenaient de la récolte 1958. Pour donner plus de valeur à ce travail nous avons cependant estimé indispensable de leur ajoindre, d'une part 2 jus de vinifera (Chasselas et Muller-Thurgau) que nous possédions de la récolte 1957 et d'autre part 3 jus blancs du commerce numérotés de 1 à 3.

La première difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés a été la détermination de la date de récolte, c'est-à-dire le choix du stade de maturation optimum pour l'obtention de jus de raisin. Exception faite des indications fournies par NEGRE, AFFRE et MARICHAL (2) qui ont constaté qu'un rapport S/A, sucres sur acidité (en g SO_4H_2), de 45 satisfaisait le plus grand nombre de dégustateurs, nous ne possédions aucune autre donnée sur cette question fondamentale.

Dans ces conditions nous avons procédé, au cours de l'été 1958, donc avant les vendanges, à un essai très simple destiné à éclaircir ce problème.

Trois jus, présentant les caractéristiques suivantes :

1. — Sylvaner : 188 g de sucre/l, 7,7 g SO_4H_2/l, S/A : 24,4 ;
2. — Muller-Thurgau : 160 g de sucre/l, 4, 4 g SO_4H_2/l, S/A : 36,4 ;
3. — Jus du commerce : 170 g de sucre/l, 5, 8 g SO_4H_2/l, S/A : 29,3 ;

ont subi des corrections, par addition de sucre ou d'acide citrique, de façon à obtenir pour chacun d'eux une gamme de 3 rapports S/A différents :

1. — Sylvaner : 20,4 24,4 37,4.
2. — Muller-Thurgau : 27,1 36,4 47,7.
3. — Jus du commerce : 23,3 29,3 37,9.

Ces jus ayant ensuite été présentés à une vingtaine de dégustateurs, la préférence de la quasi-totalité d'entre eux se porta sur les jus de Sylvaner à rapport S/A de 24,4, de Muller-Thurgau à rapport S/A de 27,1 et le jus du commerce à rapport S/A de 23,3.

Ces résultats diffèrent notablement des indications précédentes, peut-être du fait que nos dégustations ont eu lieu exclusivement en été? Quoiqu'il en soit nous avons décidé de les appliquer à notre cas, de sorte que la cueillette 1958 des raisins a été faite, dans la mesure du possible, au moment où les variétés d'hybrides retenues présentaient un rapport sucres sur acidité voisin de 22 à 25.

Quelques heures après leur récolte les raisins étaient pressés sur un petit pressoir à vis d'une contenance d'environ 25 kg et le jus, recueilli en flacons de 10 litres, légèrement sulfité puis débourbé au frigorifique à + 1°C durant 12 heures environ. Après décantation, le jus était mis en bouteilles de 33 cl préalablement désinfectées à l'aide d'une solution

d'acide sulfureux à 3 p. 100. Après chauffage au bain-marie à 76°-78°C les bouteilles étaient enfin fermées par des bouchons couronnes. Bien qu'ayant obtenu des jus de limpidité irrégulière de variété à variété, cette méthode tout à fait artisanale nous a donné de bons résultats, aucun accident de conservation ne s'étant produit par la suite.

IV. — Analyse des jus.

Après une analyse rapide effectuée au moment de leur préparation, les jus ont été analysés en détail à l'époque de leur dégustation, c'est-à-dire en juillet 1959.

Les résultats d'ensemble se trouvent réunis dans le tableau IV et les méthodes suivantes ont été utilisées :

1. — Densité au mustimètre à 15°C.

2. — Alcool par distillation et détermination densimétrique. (Un seul jus du commerce a présenté une très faible teneur alcoolique, sans influence sur son caractère organoleptique.)

3. — Acidité totale par titrimétrie à la soude N/10 sur 5 ml de jus additionné de phénophtaléine. A ce sujet il importe de remarquer que la précipitation d'une quantité variable de bitartrate de potassium durant la conservation des jus, en abaissant le taux d'acidité primitivement constaté, a relevé le rapport S/A de quelques unités dans la plupart des cas.

4. — Acide sulfureux libre et total par la méthode Ripper (modification Moreau et Vinet sur 10 ml de jus).

5. — Sucres par la méthode Gabriel-Bertrand. Mis à part les deux extrêmes, la teneur en sucres des jus est comprise entre 160 et 215 g par litre.

6. — Extrait sec de 5 ml de jus au bain-marie à 100°C.

7. — Cendres par incinération de l'extrait sec de 5 ml de jus.

8. — Alcalinité des cendres de 5 ml de jus.

9. — Détermination du pH à l'aide d'un pHmètre Tacussel à électrode de verre. Les résultats sont compris entre 2,3 et 3,1.

V. — Dégustation des jus.

A. — Méthode utilisée.

La technique de dégustation la plus couramment utilisée consiste à réunir un jury dont la compétence est, en principe, un fait reconnu. Après avoir déterminé une note commune pour un échantillon témoin, chaque juré procède, plus ou moins isolement, à la notation des échantillons suivant une échelle qui va d'ordinaire de 0 à 10. A la fin des opé-

Tableau IV

Analyses des jus de raisins.

Variétés	Densité 15°C	Alcool	Acidité totale		Acide sulfureux libre mg/l	Acide sulfureux total mg/l	Sucres réducteurs g/l	Extrait sec total g/l	Extrait sec après déduction des sucres	Cendres g/l	Alcalinité des cendres méq.	pH	Sucres
			SO_4H_2 g/l	méq.									Acidité S/A
Muller-Thurgau	1073,0	0	4,4	90	15	30	160,0	177,0	17	3,4	36	3,1	36,4
191-1 Kuhlmann	1084,4	0	6,5	132	10	25	182,5	209,6	27,1	4,4	42	2,9	28,1
252-1 Kuhlmann	1113,5	0	9,2	188	15	35	265,0	284,6	19,6	3,8	40	2,7	28,8
4643 Seibel	1077,6	0	7,0	142	10	25	178,0	191,8	13,8	2,7	31	2,6	25,4
5409 Seibel	1074,5	0	6,7	136	10	40	174,6	185,5	11,5	2,7	32	2,6	26,0
4986 Seibel	1085,6	0	8,2	168	10	30	217,5	210,2	7,3	2,4	20	2,5	26,5
9110 Seibel	1082,4	0	6,4	130	22	75	180,0	201,4	21,4	3,0	30	2,6	28,1
14596 Seibel	1072,5	0	6,0	122	70	190	174,0	183,4	9,4	2,3	24	2,5	29,0
14664 Seibel	1074,5	0	6,5	132	8	22	175,0	194,2	19,2	1,8	27	2,4	26,9
5276 Seyve-Villard	1067,5	0	6,2	126	5	20	150,0	179,0	29,4	2,0	24	2,5	24,2
14287 Seyve-Villard	1076,0	0	6,7	138	10	25	170,0	190,4	20,4	1,7	24	2,3	25,4
22 A Baco	1076,2	0	9,7	198	25	75	182,0	185,7	3,7	3,2	28	2,6	18,8
3 Rudelin	1087,7	0	8,3	170	15	50	215,0	219,9	4,9	3,0	29	2,4	25,9
244 Landot	1072,7	0	6,9	140	20	50	175,0	186,0	11,0	2,3	33	2,6	25,4
2282 Landot	1076,0	0	6,8	140	5	20	190,0	199,4	9,4	1,6	26	2,4	27,9
426 Chambeaudière	1083,0	0	7,5	154	15	55	192,5	205,4	12,9	2,4	32	2,5	25,7
Chasselas	1076,2	0	4,4	90	35	90	185,0	193,2	8,2	3,3	28	2,8	42,0
Commerce 1	1069,2	0	5,4	110	5	15	162,5	170,2	7,7	3,0	32	2,8	30,1
Commerce 2	1056,0	0°35	6,9	140	5	30	127,5	140,2	12,7	2,8	36	2,7	18,5
Commerce 3	1069,0	0	5,6	114	5	15	162,5	174,0	11,5	2,3	28	2,7	29,0

rations, les moyennes des notes des différents échantillons servent à établir leur classement définitif.

En ce qui nous concerne nous avons jugé préférable de nous adresser à des personnes dont toutes n'étaient pas spécialement préparées à un tel exercice mais qui présentaient néanmoins un critère commun : *celui de posséder un préjugé favorable à l'encontre des jus de fruits en général.* Il s'agissait donc en définitive de clients en puissance, fait qu'on ne peut considérer comme négligeable.

En conséquence nous avons opté pour l'utilisation de la *méthode de l'échelle hédonique,* méthode qui a fait l'objet d'une note de M. RIVES (4) dans ces mêmes Annales, de sorte qu'il paraît inutile d'y revenir en détail.

Précisons seulement qu'il s'agit de faire noter aux jurés qui dégustent individuellement, sans contact avec leurs collègues, les différents échantillons non par des notes chiffrées mais par des locutions préparées à l'avance.

Dans le cas qui nous occupe, chaque dégustateur était en possession d'une formule représentée sur la figure 1 comprenant 9 appréciations allant de « me plaît énormément » à « me déplaît énormément ». Au fur et à mesure des dégustations il lui suffisait de cocher la case correspondant à son jugement particulier. Dans le but de réduire l'influence que certains effets spéciaux (effet de contraste et effet de position) sont susceptibles d'exercer, nous avons, de plus, modifié l'ordre de présentation des échantillons après chaque série de dégustation.

Par la suite ces réponses ont été remplacées par des notes chiffrées de 1 à 9, ce qui nous a permis de les interpréter statistiquement au moyen de l'analyse de la variance.

B. — Choix des dégustateurs valables.

Après avoir retenu sans discrimination préalable, les 25 personnes qui s'étaient mises à notre disposition, nous avons pensé pouvoir augmenter la précision de nos résultats par l'élimination des dégustateurs peu doués pour cet exercice.

Pour réaliser cette élimination nous avons demandé aux candidats d'effectuer deux séries de dégustations à un ou deux jours d'intervalle et avons confronté les résultats obtenus. Estimant, d'autre part, que des écarts faibles étaient beaucoup moins graves que des écarts importants, nous avons classé nos dégustateurs d'après la somme des carrés des écarts entre les notes de leur première et celles de leur seconde dégustation. Cette classification faite, nous avons enfin éliminé toutes les personnes dont la somme des carrés des écarts était supérieure à 80. Ce nombre correspond, dans le cas présent, à un écart moyen de 2 unités par échan-

Station de Recherches Viticoles et Oenologiques d'Alsace	DEGUSTATION DE JUS de RAISINS	Date: 3.7.59

Nom et Prénom: ADRIAN Antoine

Echelle de notation:	ECHANTILLONS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Me plaît énormément																				
Me plaît beaucoup														X						
Me plaît assez				X	X							X	X			X				
Me plaît un peu	X	X				X												X		
Ne me plaît ni ne me déplaît							X												X	
Me déplaît un peu								X			X				X					
Me déplaît assez			X						X											X
Me déplaît beaucoup										X							X			
Me déplaît énormément																				

FIG. 1.

tillon, ce qui nous semble constituer une limite maximum pour un dégustateur valable. Entre le meilleur et le plus mauvais résultat il y a d'ailleurs eu une marge très considérable puisque la somme des carrés des écarts du premier a été de 17 et celle du dernier de 219 (un même échantillon ayant été noté un jour : me plaît beaucoup et le jour suivant : me déplaît beaucoup!). A titre d'exemple nous avons fait figurer dans le tableau V les résultats d'un bon et d'un mauvais dégustateur. Sur les 25 dégustateurs initiaux nous avons ainsi pu en retenir 13 (4 dames et 9 messieurs) dont les notes moyennes des deux séries de dégustation (tableau VI) ont été analysées statistiquement.

TABLEAU V

Notation des jus par un bon et par un mauvais dégustateur.

Résultats d'un bon dégustateur					Résultats d'un mauvais dégustateur				
Notes première dégustation	Notes seconde dégustation	Écarts	Carrés des écarts	Notes moyennes	Notes première dégustation	Notes seconde dégustation	Écarts	Carrés des écarts	Notes moyennes
7	6	— 1	1	6,5	5	7	+ 2	4	6,0
8	6	— 2	4	7,0	8	5	— 3	9	6,5
3	3	0	0	3,0	8	7	— 1	1	7,5
8	7	— 1	1	7,5	9	9	0	0	9,0
8	7	— 1	1	7,5	8	7	— 1	1	7,5
7	6	— 1	1	6,5	8	5	— 3	9	6,5
5	5	0	0	5,0	7	4	— 3	9	5,5
2	4	+ 2	4	3,0	6	3	— 3	9	4,5
1	3	+ 2	4	2,0	8	3	— 5	25	5,5
2	2	0	0	2,0	1	1	0	0	1,0
5	4	— 1	1	4,5	6	1	— 5	25	3,5
6	7	+ 1	1	6,5	5	6	+ 1	1	5,5
7	7	0	0	7,0	7	6	— 1	1	6,5
6	8	+ 2	4	7,0	7	7	0	0	7,0
4	4	0	0	4,0	6	3	— 3	9	4,5
6	7	+ 1	1	6,5	3	7	+ 4	16	5,0
1	2	+ 1	1	1,5	1	3	+ 2	4	2,0
5	6	+ 1	1	5,5	7	5	— 2	4	6,0
7	5	— 2	4	6,0	5	5	0	0	5,0
2	3	+ 1	1	2,5	7	7	0	0	7,0
Somme des carrés des écarts : 30					Somme des carrés des écarts : 127				

C. — Résultats de la dégustation.

Les résultats globaux de la dégustation des jus qui a eu lieu les 7, 8 et 9 juillet 1959 sont consignés dans les tableaux VI à VIII.

Le tableau VI montre le détail des notations données par les dégustateurs après transformation de leurs appréciations en notes chiffrées. Comme on s'y attendait l'application de l'échelle hédonique a effectivement évité une limitation de l'échelle des notes qui s'étend, dans la majorité des cas, entre 1,5 et 7,5.

La comparaison de la variance « entre dégustateurs » et de la variance résiduelle (tableau VII) fait ressortir l'existence de différences significatives entre les notations par dégustateur. Compte tenu de la disparité inévitable des goûts, ces dernières ne nous semblent cependant pas exagérées.

TABLEAU VI

Résultats de la dégustation (après transformation des locutions).

Variétés	Dégustateurs													Moyenne par jus
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1- Muller-Thurgau	3,5	7,0	3,5	6,5	6,5	3,5	8,5	5,0	2,5	5,0	7,0	2,0	3,0	4,88
2- 9110 S.....	2,5	7,5	4,5	7,0	7,5	4,0	8,0	4,0	4,0	4,0	3,0	6,5	6,0	5,27
3- 252-1 K.....	6,5	6,5	6,5	3,0	6,0	5,5	5,5	8,0	2,5	4,5	8,0	6,5	4,5	5,65
4- 191-1 K.....	5,5	7,0	4,0	7,5	7,0	6,0	7,0	9,0	8,0	6,0	5,5	7,0	8,0	6,73
5- 14.287 S.V.....	6,5	6,5	4,5	7,5	8,0	5,0	7,5	1,5	4,0	6,5	6,0	4,0	5,0	5,58
6- Commerce 1	7,5	7,5	2,5	6,5	5,0	5,5	5,5	6,0	6,0	2,5	1,0	5,5	4,0	5,00
7- 5.276 S.V.....	5,5	6,5	6,0	5,0	7,0	5,5	7,5	7,0	7,0	3,5	4,0	5,5	7,5	5,96
8- 14.664 S.....	5,5	5,5	5,5	3,0	6,5	4,0	6,0	3,5	5,0	4,0	4,5	2,0	6,0	4,69
9- 2.282 L.	6,0	5,0	7,0	2,0	5,5	5,5	7,0	4,5	6,5	3,5	3,0	6,0	6,0	5,19
10- 426 Ch.	1,5	2,5	1,5	2,0	1,5	3,0	6,5	1,0	2,5	1,0	3,0	4,0	4,5	2,65
11- 4.986 S.....	2,5	6,5	2,0	4,5	1,0	3,0	6,5	1,5	1,0	1,0	2,5	5,5	4,0	3,19
12- 4.643 S.....	5,5	6,5	5,0	6,5	6,0	6,5	8,0	4,5	6,5	5,5	3,0	6,0	6,0	5,81
13- 244 L.	5,5	5,5	7.0	7,0	6,5	5,5	7,5	5,5	5,0	6,0	5,5	6,5	5,0	6,00
14- Rudelin 3	7,5	4,0	6,5	7,0	6,5	5,5	7,5	7,0	4,5	6,5	1,5	7,0	5,0	5,85
15- Commerce 2	6,0	4,5	3,0	4,0	2,0	5,5	3,5	2,0	1,0	1,0	3,5	4,0	3,5	3,35
16- Chasselas	6,5	6,5	8,0	6,5	7,0	4,5	5,0	6,0	4,0	6,0	1,0	9,0	7,5	5,96
17- Bacco 22 A.....	2,0	4,0	5,5	1,5	6,0	5,5	3,5	3,0	4,5	4,5	2,0	4,0	5,5	3,96
18- 5.409 S.....	2,5	5,5	7,0	5,5	6,0	4,0	6,5	3,5	6,5	3,0	2,0	6,0	6,0	4,92
19- 14.596 S.....	3,5	3,0	7,0	6,0	4,0	4,5	7,0	5,5	5,0	5,0	3,5	4,5	6,0	4,96
20- Commerce 3	6,0	5,0	6,0	2,5	5,0	5,5	5,0	5,0	4,0	3,0	3,5	4,5	7,5	4,81
Moyenne par dégustateur	4,90	5,62	5,12	5,05	5,52	4,87	6,45	4,65	4,50	4,10	3,65	5,30	5,52	

La comparaison de la variance « entre variétés » et de la variance résiduelle révèle l'existence de différences significatives entre les jus expérimentés. Au seuil 0,05 deux jus peuvent être considérés comme étant significativement différents lorsque leur écart dépasse 1,14. La précision de cet essai est donc assez médiocre mais, étant donné la nature subjective des comparaisons à faire, il ne faut pas s'en étonner outre mesure.

TABLEAU VII

Origine de la variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Variances
Total	89 564		
Entre dégustateurs	12 354	12	1029,5
Entre variétés	26 982	19	1420,1
Résiduelle	50 228	228	220,3

Le classement par ordre de notes décroissantes des jus se trouve dans le tableau VIII. Dans les conditions de notre essai de dégustation les 6 premières variétés peuvent être considérées comme égales et mériteraient

donc d'être tout particulièrement prises en considération pour l'obtention de jus de raisin.

TABLEAU VIII

Notations moyennes des jus expérimentés.

Variétés	Notes moyennes	Notes d'un jury de professionnels
191-1 Kuhlmann	6,73	8,0
244 Landot	6,00	7,0
5276 Seyve-Villard	5,96	7,0
Chasselas	5,96	6,5
3 Rudelin	5,85	6,0
4643 Seibel	5,81	8,0
252-1 Kuhlmann	5,65	7,5
14 287 Seyve-Villard	5,58	5,5
9110 Seibel	5,27	5,0
2282 Landot	5,19	6,5
Commerce 1	5,00	7,5
14 596 Seibel	4,96	4,0
5409 Seibel	4,92	6,5
MullerrThurgau	4,88	4,0
Commerce 3	4,81	5,0
14 664 Seibel	4,69	4,5
22 A Baco	3,96	6,0
Commerce 2	3,35	3,0
4986 Seibel	3.19	3,0
426 Chambeaudière	2,65	4,0

Dans le même tableau nous avons également fait figurer les notes données à ces mêmes jus par un jury composé de professionnels de l'Industrie des jus de fruits et de dégustateurs entraînés. On remarquera tout particulièrement que les divergences entre les deux séries de résultats ne sont pas excessives (coefficient de corrélation $r = + 0,76$).

Signalons enfin que les dégustateurs de sexe féminin (n° 5, 8, 10 et 11 du tableau VI) ont noté dans l'ensemble avec plus de sévérité que les dégustateurs masculins.

VI. — Conclusion.

Notre essai d'obtention et de dégustation de jus de raisins provenant d'hybrides producteurs a donc montré que certains hybrides étaient capables de donner des jus de qualité organoleptique satisfaisante et supérieure à celle de jus de raisins actuellement commercialisés.

Parmi les variétés expérimentées, cinq mériteraient plus spécialement d'être prises en considération pour cette utilisation :

Trois variétés à raisins noirs pouvant servir à la production de jus rouges qui semblent, de façon générale, mieux plaire au public que les jus blancs :

— Le 191-1 Kuhlmann dont la production moyenne de trois années a été de 84,3 hectolitres à l'hectare.

— Le 244 Landot dont la culture est assez répandue dans le centre et le nord-est de la France (production moyenne 77,7 hectolitres à l'hectare).

— Le 4643 Seibel (121,5 hectolitres à l'hectare).

Deux variétés à raisins blancs:

— Le 5276 Seyve-Villard, également assez répandu (98,5 hectolitres à l'hectare).

— Le 3 Rudelin (103,1 hectolitres à l'hectare).

Il reste bien entendu que cette première série d'essais a eu surtout pour objet de mettre au point une méthode et que ses résultats doivent être considérés comme préliminaires.

Reçu pour publication le 10 *décembre* 1959.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FLANZY (M.). — Caractéristiques des raisins. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, IX A 113-A 141, 1955.

PULLIAT (V.). — Mille variétés de vignes. Montpellier, Coulet éd., 1888.

NEGRE (E.), AFFRE (J. P.) et MARICHAL (M.). — Pour une amélioration de l'industrie du jus de raisin. *Annales E. N. A. Montpellier*, XXVIII, Fasc. I et II, 5-117, 1949.

RIVES (M.). — Note sur la méthode de l'échelle hédonique pour mesurer les préférences gustatives. *Annales de Technologie*, **8**, 101-105, 1959.

APPLICATION DE L'ANTHRONE AU DOSAGE DES SUCRES FERMENTESCIBLES DU VIN

PAR

G. GUIMBERTEAU

Station agronomique et œnologique, Bordeaux.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Méthode de dosage.
A. — Principe.
B. — Historique.

III. — Recherche expérimentale.
A. — Étude de la réaction.
B. — Valeur de la méthode (Possibilités pratiques).

IV. — Application à l'analyse des vins.
A. — Dosage des différents glucides.
B. — Documentation œnologique obtenue.

V. — Résumé et conclusions.

VI. — Références bibliographiques.

I. — INTRODUCTION

Les vins, issus d'une fermentation alcoolique complète, contiennent toujours une certaine proportion de sucres fermentescibles, constitués par du fructose et du glucose. Ces glucides représentent le plus souvent quelques grammes ou même seulement quelques fractions de gramme par litre. En quantité supérieure à deux grammes par litre ils peuvent être gênants pour la conservation du vin. Le vin n'est pas stable, il peut fermenter à nouveau ou être le siège d'une prolifération bactérienne.

La détermination des seuls glucides fermentescibles n'est pas effectuée de façon courante, les différentes méthodes de dosage spécifique des différents glucides du vin (1) étant longues et délicates. Une méthode simple et rapide rendrait pourtant service aussi bien en vinification que pendant la conservation. La détermination la plus courante concernant les sucres est celle des sucres réducteurs, par les méthodes FEHLING ou BERTRAND. Par ces méthodes, à côté des glucides fermentescibles on dose des glucides infermentescibles, des pentoses présents dans tous les vins et se trouvant parfois en quantité voisine du gramme par litre. D'après les travaux récents de GUICHARD (2) le l-arabinose serait dans les vins le pentose essentiel, accompagné dans certains cas par du d-xylose, en quantité faible, en moyenne 50 mg par litre ; cet auteur n'a pas trouvé de l-rhamnose dans les vins qu'il a analysés.

Nous avons étudié la réaction à l'anthrone dans le but de connaître les possibilités qu'elle pouvait offrir dans le dosage des divers glucides du vin, en particulier en ce qui concerne les glucides fermentescibles.

II. — MÉTHODE DE DOSAGE.

A. — Principe.

L'anthrone (9-10 dihydrocétoanthracène) en solution dans l'acide sulfurique concentré est un réactif de certains glucides, avec lesquels il donne un composé de couleur verte. La réaction est basée sur la formation d'un corps coloré entre l'anthrone et le produit de déshydratation des glucides. Dans le cas des hexoses, on obtient par action de l'acide sulfurique concentré de l'hydroxyméthylfurfural qui donne avec l'anthrone dans des conditions précises un composé vert dont l'intensité de coloration peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

B. — Historique.

C'est en 1946, que DREYWOOD (3) signale l'utilité de l'anthrone en solution sulfurique concentrée pour déterminer la présence des glucides dans les hauts polymères. Cette réaction a donné lieu à de nombreuses applications, elle est utilisée pour la révélation des composés glucidiques séparés par chromatographie sur papier. FAIRBAIRN (4) en 1953 a décrit une méthode quantitative de détermination des glucides par le réactif à l'anthrone, et récemment HAAS et FLEISCHMAN (5) ont appliqué la réaction au dosage des glucides de la bière.

III. — RECHERCHE EXPÉRIMENTALE

A. — Étude de la réaction.

Réactifs.

Acide sulfurique à 75 p. 100 en volume : dans un ballon en pyrex contenant 250 ml d'eau distillée, on verse avec précaution 750 ml d'acide sulfurique concentré RP pour analyses.

Réactif à l'anthrone à 0,1 p. 100 dans l'acide sulfurique à 75 p. 100 : dans un erlenmeyer de 300 ml bouchant émeri, on pèse 200 mg d'anthrone, on ajoute 200 ml d'acide sulfurique à 75 p. 100 en volume et on agite jusqu'à parfaite dissolution. Ce réactif doit être employé fraîchement préparé.

Mode opératoire de la réaction.

On prépare à raison de 1 gramme par litre dans l'eau distillée des solutions de glucose, fructose, arabinose et galactose. Dans un tube à essai en pyrex, bouchant émeri, on introduit 1 ml d'une solution contenant 100 mg de glucide, préparée par dilution à partir de la solution à 1 gramme par litre. On ajoute 10 ml de réactif à l'anthrone. L'addition de ce réactif doit être progressive et effectuée en maintenant le tube dans un bain de glace, pour éviter toute élévation brutale de température. Après homogénéisation le tube est placé pendant 12 minutes, très exactement, dans un bain-marie dont la température est maintenue régulièrement à 100°C. Après refroidissement à la température ambiante, l'intensité de coloration du composé obtenu est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre, par rapport à un témoin effectué dans les mêmes conditions mais avec 1 ml d'eau distillée au lieu de 1 ml de solution glucidique.

Expériences générales.

Dans les conditions analytiques décrites, nous avons tracé les spectres d'absorption des composés colorés obtenus avec le fructose, le glucose, l'arabinose et le galactose. Dans la région du spectre étudié, entre 4 500 Å et 7 000 Å, le réactif à l'anthrone donne avec le fructose, le glucose et le galactose des composés colorés présentant un maximum d'absorption à 6 200 Å (fig. 1) ; l'arabinose par contre donne un composé de coloration très faible et ne présentant aucun pic caractéristique. De l'examen des spectres d'absorption obtenus il ressort :

1° Les intensités de coloration doivent être mesurées à 6 200 Å.

2° En quantité équivalente, l'arabinose par rapport au fructose et au glucose ne donne qu'un composé de coloration très faible, et une

possibilité de déterminer ces deux derniers glucides en présence d'arabinose peut être envisagée.

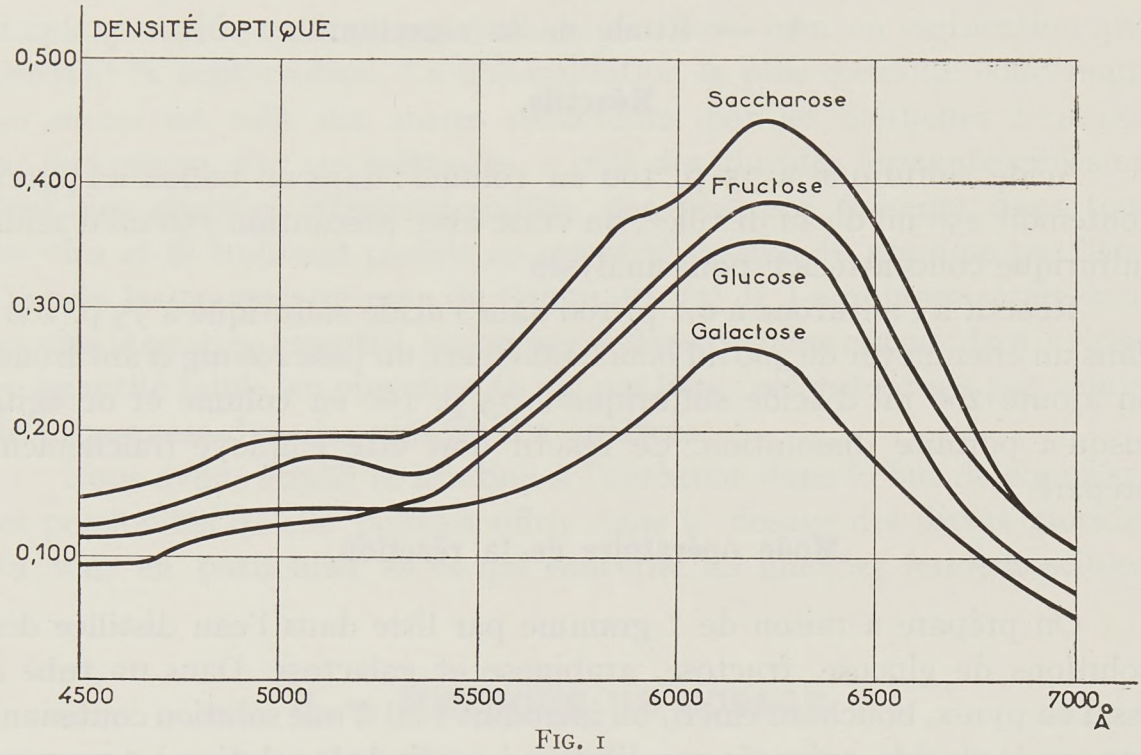


FIG. 1

Nous avons étudié l'action de l'anthrone sur le galactose, ce dernier glucide étant libéré par hydrolyse des galactanes pouvant entrer dans la

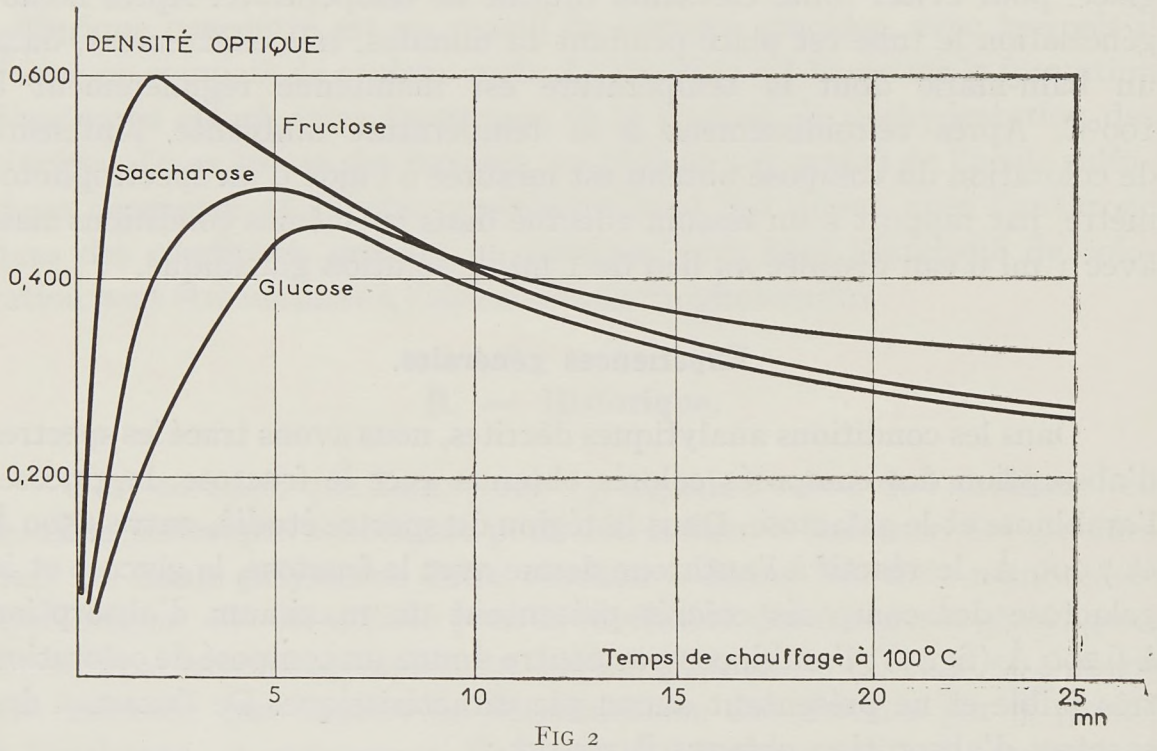


FIG 2

constitution des gommes et des mucilages ; le composé coloré obtenu a une intensité de coloration représentant environ les 7/10 de celle obtenue avec le fructose ou le glucose.

Nous avons ensuite étudié l'influence du temps de chauffage sur l'intensité de coloration du composé obtenu avec le fructose et le glucose en présence de réactif à l'anthrone. Avec le fructose on observe un développement rapide de la coloration et après deux minutes de chauffage à 100°C, on obtient le maximum d'intensité puis la coloration diminue progressivement à mesure que l'on prolonge le temps de chauffage. Pour le glucose, il faut attendre six minutes pour atteindre le maximum d'intensité de coloration, puis comme pour le fructose on observe une diminution de coloration. Après dix minutes de chauffage le fructose et le glucose en quantités équivalentes, donnent des composés dont l'intensité de coloration est sensiblement la même (fig. 2). Le fructose se transforme plus facilement en hydroxyméthylfurfural que le glucose, c'est ce fait qui peut expliquer les différences observées.

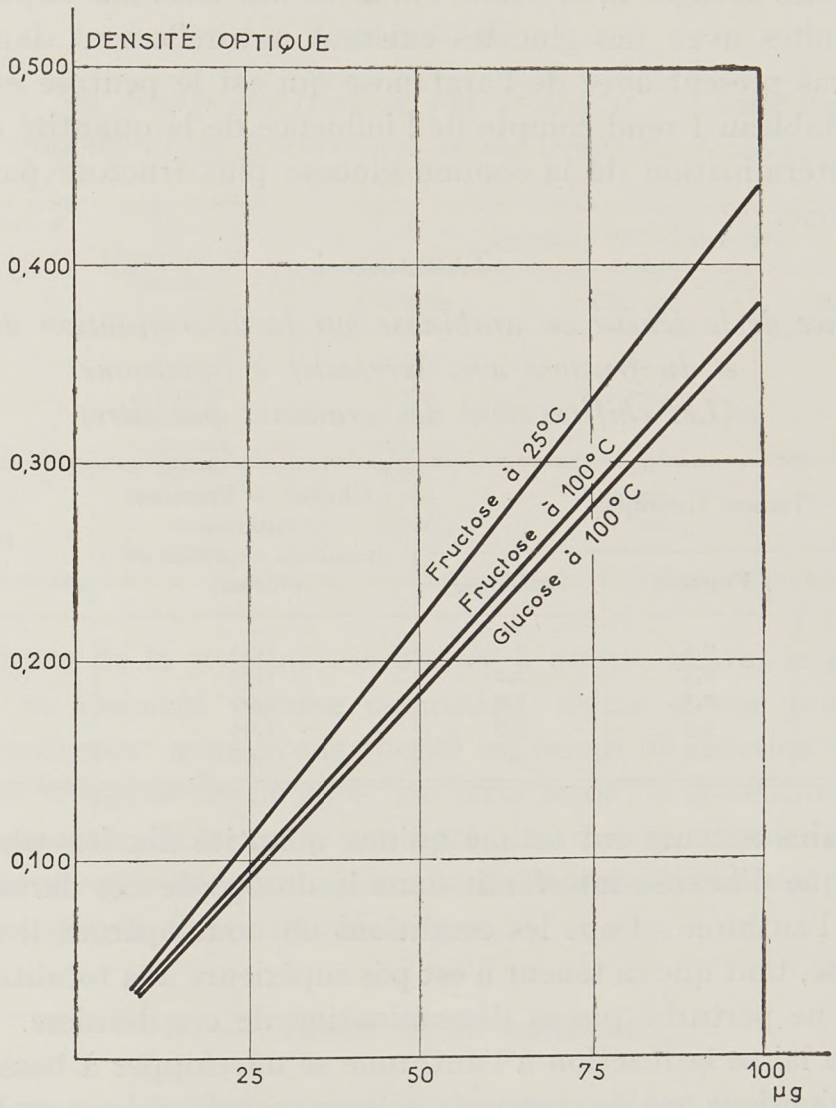


Fig. 3

Nous avons ensuite tracé pour le fructose et le glucose les courbes représentant l'intensité de coloration de chaque composé obtenu en fonction de la quantité de glucide mise en œuvre. Les courbes obtenues sont

des droites entre 20 et 120 µg de glucide contenu dans la prise d'essai (fig. 3). La pente de la droite obtenue avec les solutions de fructose est légèrement différente de celle obtenue avec le glucose, comme d'ailleurs les résultats consignés sur la figure 2 pouvaient le laisser prévoir.

En travaillant toujours sur des solutions simples nous avons étudié l'influence des pentoses sur la détermination du glucose et du fructose avec le réactif à l'anthrone. Notre travail étant effectué dans le but de mettre au point des dosages intéressant l'analyse des vins, nos expériences ont été conduites avec des glucides existant naturellement dans les vins, dans le cas présent avec de l'arabinose qui est le pentose essentiel des vins. Le tableau I rend compte de l'influence de la quantité d'arabinose sur la détermination de la somme glucose plus fructose par le réactif à l'anthrone.

TABLEAU I

Influence de la teneur en arabinose sur la détermination du glucose et du fructose avec le réactif à l'anthrone.
(Les chiffres sont des grammes par litre).

Teneurs théoriques			Glucose + Fructose retrouvée (résultats exprimés en glucose)	Différence
Glucose	Fructose	Arabinose		
1,0	0,5	0	1,55	+ 0,05
1,0	0,5	0,2	1,55	+ 0,05
1,0	0,5	1,0	1,60	+ 0,1
1,0	0,5	2,0	1,65	+ 0,15
1,0	0,5	4,0	1,90	+ 0,40

Certains auteurs ont estimé qu'une quantité dix fois plus faible de pentose que d'hexose interférait dans le dosage de ces derniers avec le réactif à l'anthrone. Dans les conditions où nous opérons il semble que l'arabinose, tant que sa teneur n'est pas supérieure à la totalité des autres glucides, ne perturbe pas la détermination de ces derniers.

Si on laisse la réaction à l'anthrone se développer à basse température on n'obtient pas de composés colorés pour le glucose et l'arabinose, seul le fructose réagit. Ce fait nous a amené à considérer la possibilité de doser le fructose en présence des autres glucides. On fait agir le réactif sulfurique à l'anthrone sur des solutions de glucose, fructose, arabinose et saccharose pendant quatre heures à 20°C et l'on détermine pour les différents composés obtenus le spectre d'absorption entre 4 500 et 7 000 Å. Comme déjà indiqué, le glucose et l'arabinose ne donnent aucune coloration décelable, le fructose et le saccharose donnent un composé dont le pic d'absorption se situe à 6 200 Å. Le saccharose conduit à un composé dont l'intensité de coloration égale sensiblement la moitié de celle obtenue avec le fructose (ce qui après hydrolyse correspond bien à la constitution

de ce corps). Nous avons ensuite recherché les meilleures conditions de dosage en faisant varier la température et la durée de la réaction. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II. La température de 0°C est obtenue en maintenant les tubes à essai dans un bain de glace fondante, pour les autres températures les tubes à essai sont plongés dans des cristallisoirs remplis d'eau et placés dans des étuves maintenues aux températures indiquées.

TABLEAU II

Étude du dosage du fructose par le réactif à l'anthrone. Influence de la température et du temps de réaction.

Température de la réaction	Durée de la réaction	Intensité de la coloration		
		Fructose	Glucose	Arabinose
0°	4 heures	0,065	—	—
20°	4 heures	0,260	—	—
25°	4 heures	0,390	—	—
37°	4 heures	0,445	—	—
0°	20 heures	0,065	—	—
20°	20 heures	0,260	0,010	0,015
25°	20 heures	0,600	0,020	0,020
37°	20 heures	0,450	0,080	0,070

Si la durée de la réaction est limitée à quatre heures le glucose et l'arabinose ne donnent aucune coloration, même à une température de 37°C. Finalement nous avons adopté un temps de réaction de quatre heures à une température de 25°C. De cette façon, la coloration obtenue est suffisamment intense pour permettre un dosage, d'autre part, son développement est assez lent pour que de légères différences de temps dans les dosages en séries n'influent pas.

B. — Valeur de la méthode.

La réaction à l'anthrone pratiquée sur des milieux contenant comme glucides du glucose, du fructose, de l'arabinose pourra permettre en opérant à 100°C pendant douze minutes de doser l'ensemble glucose + fructose tant que la teneur en arabinose ne dépassera pas 1,5 gramme par litre. La détermination de la quantité présente de fructose pourra être effectuée en pratiquant la réaction à l'anthrone à 25°C pendant 4 heures. La réaction conduite aussi bien à 100°C qu'à 25°C étant très sensible, les dilutions à effectuer sont très importantes. La précision obtenue avec des solutions relativement riches sera entachée des erreurs probables dues au facteur dilution qui limite dans bien des cas l'emploi de diverses méthodes colorimétriques en analyse quantitative.

IV. — APPLICATION A L'ANALYSE DES VINS

A. — Dosage des différents glucides.

Les résultats des essais précédents ont été exploités dans le but d'utiliser la réaction à l'anthrone à la détermination des divers glucides du vin. Les essais suivants porteront sur l'application dans les vins des divers dosages décrits sur des solutions simples et des applications possibles.

Influence de la défécation.

La méthode de dosage exige que l'on opère sur des solutions glucidiques aussi exemptes que possible de substances étrangères. De là, la nécessité de déféquer le vin : opération délicate et de laquelle dépend beaucoup le chiffre obtenu. Nous avons essayé les trois procédés de défécation les plus courants : la décoloration par le charbon, la défécation à l'aide de l'acétate de plomb et la défécation à l'aide du sulfate mercurique. Les résultats obtenus étant très voisins, nous avons adopté la décoloration par le charbon qui est simple et donne toujours un vin incolore et limpide. La réaction analytique étant très sensible, il faut diluer le vin de façon importante, mais même pour les vins blancs la réaction à l'anthrone ne devra pas être pratiquée directement sur le liquide obtenu par dilution, il faudra dans tous les cas faire subir au vin une défécation. Le tableau III montre les différences que l'on obtient en pratiquant la réaction à l'anthrone sur des vins blancs, déféqués et non déféqués.

TABLEAU III

Influence de la défécation sur le dosage des sucres fermentescibles des vins blancs par le réactif à l'anthrone.
(Les chiffres sont des grammes par litre.)

	Sucres fermentestibles	Sucres réducteurs
N° 1		
déféqué	0,80	1,20
non déféqué	1,45	
N° 2		
déféqué	1,00	1,30
non déféqué	1,30	
N° 3		
déféqué	1,86	2,40
non déféqué	2,44	

Détermination des sucres fermentescibles du vin.

Après décoloration par la quantité juste nécessaire de charbon le vin est dilué de façon à ce que la solution obtenue contienne par millilitre une quantité de sucre fermentescible comprise entre 20 et 120 µg.

La suite du dosage est effectuée de la façon décrite plus haut et le chiffre obtenu pour l'intensité de coloration est porté sur la droite d'étalonnage tracée avec des solutions de titres connus de glucose. On en déduit la quantité de glucide présente.

Pour nous assurer de la spécificité et de la fidélité de la méthode décrite, nous avons effectué plusieurs essais. Les résultats sont réunis dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Étude de l'exactitude du dosage des sucres fermentescibles par le réactif sulfurique à l'anthrone. (Les chiffres sont des grammes par litre.)

	Sucres fermentescibles	Différence	Quantité retrouvée
Vin témoin	0,9		
+ 0,5 arabinose	1,0	+ 0,1	
+ 1,0 «	1,0	+ 0,1	
+ 2,0 «	1,2	+ 0,3	
+ 4,0 «	1,6	+ 0,7	
+ 0,6 glucose	1,5	0	0,6
+ 1,1 «	2,1	+ 0,1	1,2
+ 1,6 «	2,5	0	1,6
+ 0,5 fructose	1,5	+ 0,1	0,6
+ 1,0 «	2,1	+ 0,2	1,2
+ 1,5 «	2,7	+ 0,3	1,8

Dosage du fructose dans les vins.

Le mode opératoire employé est le suivant : on traite par la quantité de charbon juste nécessaire pour le décolorer un certain volume de vin, on filtre. Le filtrat est dilué de façon à obtenir une solution contenant par millilitre une quantité de fructose comprise entre 20 et 100 µg. Dans un tube à essai bouchant émeri on place un millilitre de la solution obtenue et on ajoute 10 ml de réactif à l'anthrone, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter une élévation brutale de la température. Après homogénéisation le tube est placé dans un cristallisoir contenant de l'eau à 25°C. Le cristallisoir est ensuite placé pendant quatre heures dans une étuve dont la température est maintenue constante à 25°C. Au bout de ce temps, on effectue la colorimétrie à 6 200 Å. Le résultat obtenu est porté sur une droite tracée dans les mêmes conditions à l'aide de solutions de titres connus de fructose.

Détermination des polysaccharides du vin.

On sait que lorsqu'on ajoute à un vin limpide 4 à 5 volumes d'éthanol il apparaît immédiatement un trouble abondant, qui flocule rapidement et qui après quelques jours de repos donne un dépôt plus ou moins volumineux suivant les vins. Ce précipité, qui peut représenter plusieurs

grammes de substances par litre, est constitué par les matières pectiques, les mucilages et les gommes.

Les gommes sont des osanes généralement arabanes, glucosanes et parfois galactanes. Les mucilages, qu'on rencontre surtout en abondance dans les raisins pourris sont des glucosanes. Les matières pectiques se rapprochent des gommes et des mucilages du fait qu'elles donnent avec l'eau des solutions visqueuses et que leur hydrolyse fournit entre autres sucres, de l'arabinose.

Par le réactif à l'anthrone nous avons effectué le dosage de certains glucides sur le précipité obtenu par l'éthanol dans différents vins. Nous avons opéré de la façon suivante : dans une fiole jaugée de 250 ml on introduit 50 ml de vin puis on complète au trait de jauge avec de l'éthanol à 96°. On mélange et on laisse en repos pendant quelques jours à la température ambiante. On décante ensuite l'alcool limpide et on recueille le précipité par centrifugation. On le lave à trois reprises dans le tube à centrifuger avec de l'éthanol neutre à 80°, en prenant soin de bien remettre chaque fois le dépôt en suspension. Puis on redissout le précipité dans 50 ml d'eau distillée. Parfois on observe la présence de substances insolubles étrangères, en particulier des matières tannoïdes et colorantes, aussi il est nécessaire avant d'effectuer un dosage de centrifuger le liquide. Sur un millilitre de la solution contenant les polysaccharides du vin on pratique un dosage à l'anthrone en opérant à 100°C. On exprime les résultats en glucose. Les chiffres obtenus représentent la partie du glucose et du galactose libérée par l'hydrolyse des divers anhydrides d'oses. Nous avons effectué cette détermination sur plusieurs vins blancs et rouges (tableau V).

TABLEAU V

Teneur en polysaccharides des vins.

	Sucres réducteurs g/l	Polysaccharides dosés en mg/l de glucose
Vins blancs:		
Côtes de Bourg	8,2	140
Graves supérieures	6,7	208
Loupiac	69,4	220
Ste. Croix du Mont	80,0	350
Vins rouges:		
St. Emilion	2,8	300
Médoc	3,3	300
Côtes de Fronsac	2,2	400
Margaux	2,7	320

B. — Documentation œnologique.

En utilisant le réaction à l'anthrone, nous avons effectué sur différents vins, blancs et rouges les divers dosages décrits précédemment ; les résultats sont groupés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

(*Les chiffres sont des grammes par litre*).

	Sucres réducteurs	Sucres fermentescibles	Sucres infermentescibles	Glucose	Fructose
Vins rouges					
Bordeaux	2,0	1,5	0,5	0,5	1,0
1res Côtes Bordeaux	2,8	2,0	0,8	0,8	1,2
1res Côtes Blaye	1,8	1,6	0,2	0,6	1,0
Graves	1,9	1,6	0,3	0,4	1,2
Médoc	2,0	1,0	1,0	0,2	0,8
St Émilion	3,2	1,8	1,4	0,4	1,4
Vins blancs					
Blayais	3,2	2,7	0,5	0,2	2,5
Graves	2,5	2,2	0,3	0,2	2,0
Graves supérieures	5,6	5,0	0,6	1,5	3,5

Nous avons également analysé, au point de vue teneur en divers glucides, des vins élaborés de façon différente. Les parties solides de la vendange, rafles et pellicules, sont très riches en pentose et pentosanes, et pendant la vinification l'absence ou la présence de rafle, le temps de macération des pellicules influent sur la teneur en sucres infermentescibles du vin. Le tableau VII donne les résultats des expériences de vinification. On voit que la présence de rafle augmente très nettement la teneur en pentose des vins.

TABLEAU VII

(*Les chiffres sont des grammes par litre*).

	Sucres réducteurs	Sucres fermentescibles	Sucres infermentescibles
Expérience de vinification n° 1.			
Vinification en présence de rafle :			
— écoulage à une densité de 1020	1,8	1,1	0,7
— écoulage 21 jours après la fin de la fermentation.	2,65	1,2	1,45
Vinification en l'absence de rafle :			
— écoulage à une densité de 1020	1,8	1,4	0,4
— écoulage 21 jours après la fin de la fermentation.	1,8	1,1	4,7
Expérience de vinification n° 2.			
Vendange éraflée	2,10	1,1	1,0
Vendange non éraflée	3,00	1,1	1,9
Vendange chauffée à 80 °C fermentée avec le marc.	1,85	1,3	0,6
Vendange chauffée à 80 °C fermentée sans le marc.	1,00	0,9	0,1

V. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans la première partie de notre travail nous avons étudié les facteurs température et temps de chauffage sur l'obtention des composés colorés avec divers glucides et le réactif sulfurique de l'anthrone. L'interférence de l'arabinose sur les autres glucides a été également étudiée. D'après les résultats obtenus nous avons montré les possibilités qu'offre

la réaction à l'anthrone : conduite à 100°C pour la détermination de la somme glucose + fructose et à 25°C pour le dosage du fructose seul.

La deuxième partie du travail est consacrée à l'application des méthodes décrites sur des solutions simples, à l'analyse des glucides du vin : en opérant à chaud l'utilisation du réactif à l'anthrone permet de déterminer avec une précision suffisante la somme des glucides fermentescibles. Par différence avec les sucres réducteurs nous pouvons estimer les glucides non fermentescibles. Après avoir dosé le fructose par le réactif à l'anthrone en opérant à froid, le glucose peut être obtenu ensuite par différence entre la somme des glucides fermentescibles et le fructose. Une estimation des polysaccharides est encore possible en conduisant la réaction à l'anthrone sur une partie du précipité obtenu par addition au vin d'alcool éthylique.

La détermination des sucres fermentescibles, par la réaction à l'anthrone, manipulation simple et suffisamment précise permet de mieux connaître la tenue des vins vis-à-vis des refermentations possibles, et d'effectuer rapidement les traitements nécessaires pour éviter toute altération. La teneur en sucres infermentescibles du vin reflète souvent le mode de vinification utilisé pour son élaboration ; à l'aide de l'anthrone la détermination de ces glucides pourra être effectuée facilement. Nous noterons également la grande sensibilité de la méthode décrite pour doser le fructose.

Reçu pour publication le 10 *décembre* 1959.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — Analyse et contrôle des vins, 2e édition, Librairie Ch. Béranger, Paris, 1958.
(2) Guichard (C.). — Contribution à l'étude des glucides de la vigne et de certains fruits. Thèse de pharmacie, Bordeaux 1953.
(3) Dreywood (R.). — Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Engng. Chem.*, N° de Janvier, p. 499, 1946.
(4) Fairbairn (N. J.). — A modified anthrone reagent. *Chem. and Ind.*, N° de Janvier, p. 86, 1953.
(5) Haas (G. J.) et Fleishman (A. J.). — Use of the anthrone procedure in the carbohydrate analysis of beer. *Wallerstein Laboratories*, **21**, 139, 1958.

NOTE TECHNIQUE

A PROPOS DU TEST D'ASSIMILATION DES SUCRES PAR LES LEVURES

H. GIRARD et Mme Edith LEDUC
Institut Pasteur, Laboratoire des Levures, Paris.

La recherche du pouvoir d'assimilation aérobie de sucres déterminés par les levures doit toujours compléter la mise en évidence de leur pouvoir fermentaire, lorsqu'il s'agit de l'identification d'espèces. On sait en effet que, si tous les sucres fermentés sont, de ce fait, assimilés, la réciproque n'est pas vraie.

Les méthodes utilisées pour la caractérisation du pouvoir fermentaire, sont connues et simples. Elles se résument toutes à la mise en évidence d'un dégagement de CO_2 au sein d'une culture anaérobie, dans un milieu ne contenant pas d'autre source de carbone que le sucre choisi. Nous utilisons de façon courante la technique de LANGERON et GUERRA (1).

Pour la caractérisation du pouvoir d'assimilation oxydatif, nous employons la méthode auxanographique (2) et avons mis au point la technique suivante :

Le milieu de culture de base est un extrait de levure de brasserie, *Saccharomyces carsbergensis*, de fermentation basse. 1 kg de levure industrielle, pressée et lavée, titrant 20 à 25 p. 100 d'eau, est mis en suspension homogène dans 500 ml d'eau distillée. On porte à l'ébullition douce pendant 1 heure, en agitant fréquemment. L'extrait est séparé par centrifugation ou filtration sur buchner. Le magmat résiduel est lavé au moins une fois avec un total de 500 ml d'eau distillée et les eaux de lavage jointes à l'extrait.

Cette préparation peut être utilisée immédiatement après dilution dans la proportion de 1 litre pour 4 litres d'eau distillée. Le pH est d'environ 6,6.

Nous la conservons sous forme de poudre lyophilisée. On obtient environ 30 g de poudre pour 1 kg de levure. La poudre est répartie en flacons stérilisés sous azote et se conserve pendant plusieurs mois. Elle peut être gardée au contact de l'air pendant quelque temps sans réhumidification notable. Des essais portant sur différentes techniques d'extraction et sur l'action de la température ont montré que les résultats obtenus n'étaient pas valablement modifiés.

L'extrait lyophilisé peut entrer efficacement dans la composition de milieux de cultures bactériologiques et donne de bons résultats dans les milieux employés en virologie pour la culture des tissus. Pour la réalisation du test d'assimilation aérobie des sucres par les levures, nous l'utilisons à raison de 7 g pour 1 litre d'eau distillée, gélosée avec 20 g d'agar en poudre. Il est immédiatement soluble. Après stérilisation, le milieu liquéfié est ensemencé dans la

masse avec une suspension épaisse de la levure à identifier, provenant d'un milieu solide, et coulé en boîtes de Pétri.

A la surface du milieu refroidi, on dispose des disques de papier imprégnés chacun d'un sucre différent. Ces disques peuvent aussi être préparés à l'avance et conservés en tubes après stérilisation à l'autoclave (1/4 d'heure à 110°C). Ils sont de couleur, et cette dernière est conventionnellement rapportée à la nature du sucre représenté.

L'imprégnation se fait par immersion dans une solution stérile à 30 p. 100 du sucre. On porte à l'étuve à 50°C jusqu'à évaporation complète et séchage.

La lecture du résultat est faite après 24 à 48 heures d'incubation à 25°C. Il est positif quand on distingue nettement une zone circulaire de croissance opaque autour du disque imprégné d'un sucre assimilable. Des essais effectués comparativement avec un milieu minéral enrichi en vitamines et facteurs de croissance (2,3) nous autorisent à penser que ces complexes, au moins, sont naturellement présents dans l'extrait de levure préparé comme indiqué ci-dessus.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) LANGERON (M.) et GUERRA (P.). — *Ann. Parasitol. Hum et Comp.*, **16**, 36, 1938.

(2) LODDER (J.) et KREGER-VAN RIJ (N. J. W.). — « The Yeast. A Taxonomic Study. 1952, Holland Publish Co, Amsterdam.

(3) DOMERCQ (S.). — Étude et classification des levures de vin de la Gironde. *Ann. de Technol. Agricole*, **6**, 5 à 58, 139 à 187, 1957.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 16-5-1960.
Dépôt légal : 2e trimestre 1960. *N° d'impression : 886.*

RELATION ENTRE LA DURÉE DE CONSERVATION DU LAIT ET LA TENEUR EN CALCIUM IONISÉ DE L'ULTRAFILTRAT

PAR

MARCEL SAINCLIVIER

Laboratoire de Recherches de Technologie laitière.
Centre de Recherches Agronomiques de l'Ouest.
École Nationale d'Agriculture. Rennes.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

Méthodes utilisées.

Résultats.

Vérification de l'influence bactérienne.
Relation entre la durée de conservation à 23°C et la teneur en calcium ionisé de l'ultrafiltrat de lait.
Autres relations.

Discussion.

Résumé.

Bibliographie.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, une laiterie des environs de Rennes (Ille-et-Vilaine) utilise l'épreuve à l'alcool (mélange volume à volume de lait et d'alcool à 68 p. 100) après incubation préalable des échantillons pendant un certain nombre d'heures à 23°C, pour classer selon leur qualité bactériologique des laits livrés par les producteurs.

On a parfois observé que certains échantillons de lait coagulaient à l'alcool après une courte durée d'incubation à 23°C alors que la réduction du bleu de méthylène ne se produisait qu'après 6 à 8 heures. Cette observation est en bon accord avec les résultats obtenus par ROWLANDS et

al. (1). On sait d'autre part que la coagulation du lait par la chaleur lors d'un chauffage au-dessus de 100°C est influencée par la teneur du lait en calcium (2, 3, 4 et 5) et plus particulièrement par la teneur en calcium ionisé (6 et 7). On peut donc se demander si la durée de conservation jusqu'à coagulation par l'alcool ne dépend pas, elle aussi, des variations de la teneur du lait en calcium ionisé, les facteurs d'ordre bactériologique susceptibles d'influer sur la stabilité du lait, du fait de la production d'acide l'actique par exemple, étant supposés constants.

C'est pour vérifier cette hypothèse que nous avons entrepris la présente étude.

MÉTHODES UTILISÉES

Prélèvement des échantillons.

Le troupeau laitier sur lequel ont porté nos expériences est celui de l'École Nationale d'Agriculture de Rennes. Il est composé de vaches de race normande ; le nombre de vaches en lactation a varié au cours de nos essais, suivant la saison de l'année, de 15 à 25. Les examens ont été effectués pendant deux ans (1956-1957).

Les échantillons individuels de lait étaient prélevés (environ 125 ml) dans le pot trayeur, dès que la traite de chaque vache était terminée. Un échantillon du lait de mélange était prélevé vers 15 heures à la fin de la traite sur l'ensemble des bidons de lait remplis.

Tous les prélèvements étaient effectués aseptiquement, en flacons stériles, refroidis et conservés à la glacière entre + 1° et + 5°C, jusqu'au moment où débutaient les analyses c'est-à-dire, en moyenne, une heure après la fin de la traite.

Mesure de la durée de la conservation.

On effectuait, selon MATTICK et al. (8) sur une portion du lait frais, l'épreuve à l'alcool et l'épreuve de l'ébullition de manière à séparer les échantillons de lait coagulant aussitôt après la traite.

Une autre portion de lait (10 ml) était pipettée dans un tube stérile et conservée au froid entre + 1° et + 5°C : elle servait le lendemain à l'épreuve du bleu de méthylène.

Une troisième portion était maintenue dans un bain marie muni d'un agitateur et rempli d'un mélange d'eau et de glace. Grâce à un dispositif automatique qui déclenchait les résistances chauffantes vers 23 heures (soit environ 8 heures après la fin de la traite), la température du bain-marie montait en 90 minutes de 0° à 23°C, puis se maintenait constante (à ± 0,1°C près). Le réglage du dispositif était effectué de manière à ce que les échantillons aient subi une incubation à 23°C pendant 8 à 10 heures

au moment des premiers examens le lendemain matin à 9 heures. On a reconnu en effet que, sauf le cas de laits coagulant aussitôt après la traite, il fallait au moins 8 heures à 23°C pour que l'épreuve à l'alcool fasse apparaître les premiers résultats positifs.

Après 8 heures d'incubation, et d'heure en heure, on effectuait l'épreuve à l'alcool et l'épreuve de l'ébullition et l'on notait pour chaque échantillon la duréed'incubation à 23°C nécessaire pour obtenir la coagulation du lait par l'alcool et par l'ébullition.

Avec ce mode opératoire, tous les échantillons étaient placés dans les mêmes conditions de température depuis la fin de la traite jusqu'au moment où ils coagulaient à l'alcool ou à l'épreuve de l'ébullition.

Mesure de la durée de réduction du bleu de méthylène.

Les tubes contenant 10ml de lait étaient retirés du réfrigérateur, additionnés de bleu de méthylène et mis à incuber à 37°C. On les retournait toutes les heures (9). La durée de décoloration était notée depuis la première jusqu'à la dixième heure d'incubation.

Numération des germes totaux.

On a utilisé la méthode par dilution et culture en boîte de Pétri sur le milieu suivant : peptone (ROCHE), 5 g ; lait écrèmé, 5 ml ; gélose, 15 g ; eau, 1 litre ; pH final 7,0 - 7,2 ; le milieu était autoclavé à 120°C pendant 15 minutes, additionné de 1 g de glucose par litre puis réparti en tubes et stérilisé à 115°C pendant 20 minutes.

L'ensemencement était effectué dans l'heure qui suivait la traite. La numération des colonies avait lieu après 3 jours d'incubation à 31°C sur les boîtes dont le nombre de colonies était compris entre 30 et 300.

Analyses chimiques.

Sauf indication contraire, elles étaient effectuées dans l'heure suivant la fin de la traite, de manière à refléter exactement la composition du lait frais.

DOSAGE DU CALCIUM TOTAL.

Le calcium total du lait était dosé selon la méthode de PYNE (10, 11) avec la technique de MOCQUOT et al. (12).

DOSAGE DU CALCIUM IONISÉ.

On a utilisé la méthode décrite dans la première partie de ce travail (13). L'ultrafiltration était commencée moins d'1 heure après la fin de la traite ; l'appareil à ultrafiltrer était placé dans une glacière à + 5°C.

Dosage de l'azote total et de l'azote de la caséine.

Ils étaient effectués suivant la méthode de Rowland (14).

Mesure de la température atmosphérique moyenne.

Dans un travail précédent (15), nous avons observé que la relation entre la durée de conservation du lait jusqu'à coagulation par l'alcool et la température atmosphérique, était la meilleure lorsqu'on prenait pour valeur de la température atmosphérique la moyenne arithmétique de la température maximum de la veille et de la température minimum du jour du prélèvement. C'est donc cette valeur de la température qui a été adoptée dans ce travail. (1)

RÉSULTATS

Vérification de l'influence bactérienne

Nous avons établi dans la première partie (13) de ce travail que plusieurs échantillons d'un même lait soumis à un développement plus ou moins intense de la flore microbienne, conservait la même teneur en calcium ionisé aussi longtemps que la durée de réduction du bleu de méthylène demeurait égale ou supérieure à 6 heures au moment où le lait était soumis à l'ultrafiltration. Lorsque le temps de réduction tombait au-dessous de 6 heures on constatait d'abord une légère diminution de la teneur en calcium ionisé, puis une augmentation rapide correspondant à une augmentation parallèle de la concentration en ions H résultant elle-même de la formation d'acide lactique.

Il est d'autre part bien connu que la durée de conservation à 23°C d'un lait dont la durée de réduction du bleu de méthylène est inférieure à 6 heures est d'autant plus courte que la durée de réduction du bleu de méthylène est elle-même plus courte. La prolifération microbienne (et notamment le développement de la flore lactique) est la principale responsable de la diminution de la durée de conservation.

C'est pourquoi, au cours des essais décrits ci-après, seuls les résultats provenant d'échantillons réduisant le bleu de méthylène en 6 heures ou plus, ont été pris en considération. On a vérifié en outre pour tous ces essais, en calculant les coefficients de corrélation appropriés, que la durée de réduction du bleu de méthylène n'avait pas de relation avec les variations observées dans la durée de conservation, ni avec la teneur du lait en calcium ionisé.

(1) Les températures journalières nous ont été communiquées par la Station Météorologique de Rennes Saint-Jacques à qui nous adressons ici tous nos remerciements.

Ces coefficients de corrélation sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I

Coefficients de corrélation (r) *entre durée de réduction du bleu de méthylène et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool* (A) *et à l'ébullition* (B), *et teneur en calcium ionisé* (Ca^{++}).

Significatif au seuil P = 0,95

Nombre et nature des échantillons de lait	A		B		Ca^{++}	
	r	Limites de r	r	Limites de r	r	Limites de r
25 mélange	+ 0,29	— 0,12 + 0,61	+ 0,17	— 0,25 + 0,52	— 0,28	— 0,09 — 0,80
94 individuels	+ 0,25	± 0,19	+ 0,17	± 0,20	— 0,10	± 0,20

De même on a vérifié pour un certain nombre d'échantillons (9 laits de mélange et 32 laits individuels) réduisant le bleu de méthylène en 6 heures ou plus, que le nombre de germes totaux n'avait que peu ou pas de relations avec la durée de conservation, ou avec la teneur en calcium ionisé (tableau II).

TABLEAU II

Coefficients de corrélation (r) *entre nombre de germes par ml de lait et teneur en calcium ionisé* (Ca^{++}), *durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool* (A) *et à l'ébullition* (B), *température moyenne atmosphérique* (T).

Significatif au seuil P = 0,95

Nombre et nature des échantillons de lait	Ca^{++}		A		B		T	
	r	Limites de r	r	Limites de r	r	Limites de r	r	Limites de r
9 mélange et 32 individuels	+ 0,25	— 0,18 + 0,60	— 0,26	— 0,58 + 0,05	— 0,45	— 0,16 — 0,63	+ 0,10	— 0,32 + 0,50

Relation entre la durée de conservation à 23°C et la teneur en calcium ionisé de l'ultrafiltrat de lait.

OBSERVATIONS EFFECTUÉES SUR LES ÉCHANTILLONS DE LAIT DE MÉLANGE.

Les observations ont porté sur 25 échantillons, prélevés tout au long de l'année et dont la durée de réduction du bleu de méthylène était égale ou supérieure à 6 heures. Les résultats sont indiqués sur la figure 1 et dans le tableau III. On observe que plus la teneur du lait en calcium ionisé est élevée, plus la durée de conservation du lait jusqu'à coagulation

est courte, qu'il s'agisse de la coagulation par l'acool ou de la coagulation par l'ébullition. Les coefficients de corrélation entre ces différentes données ont été calculés (tableau IV).

Laits de mélange. Laits individuels.

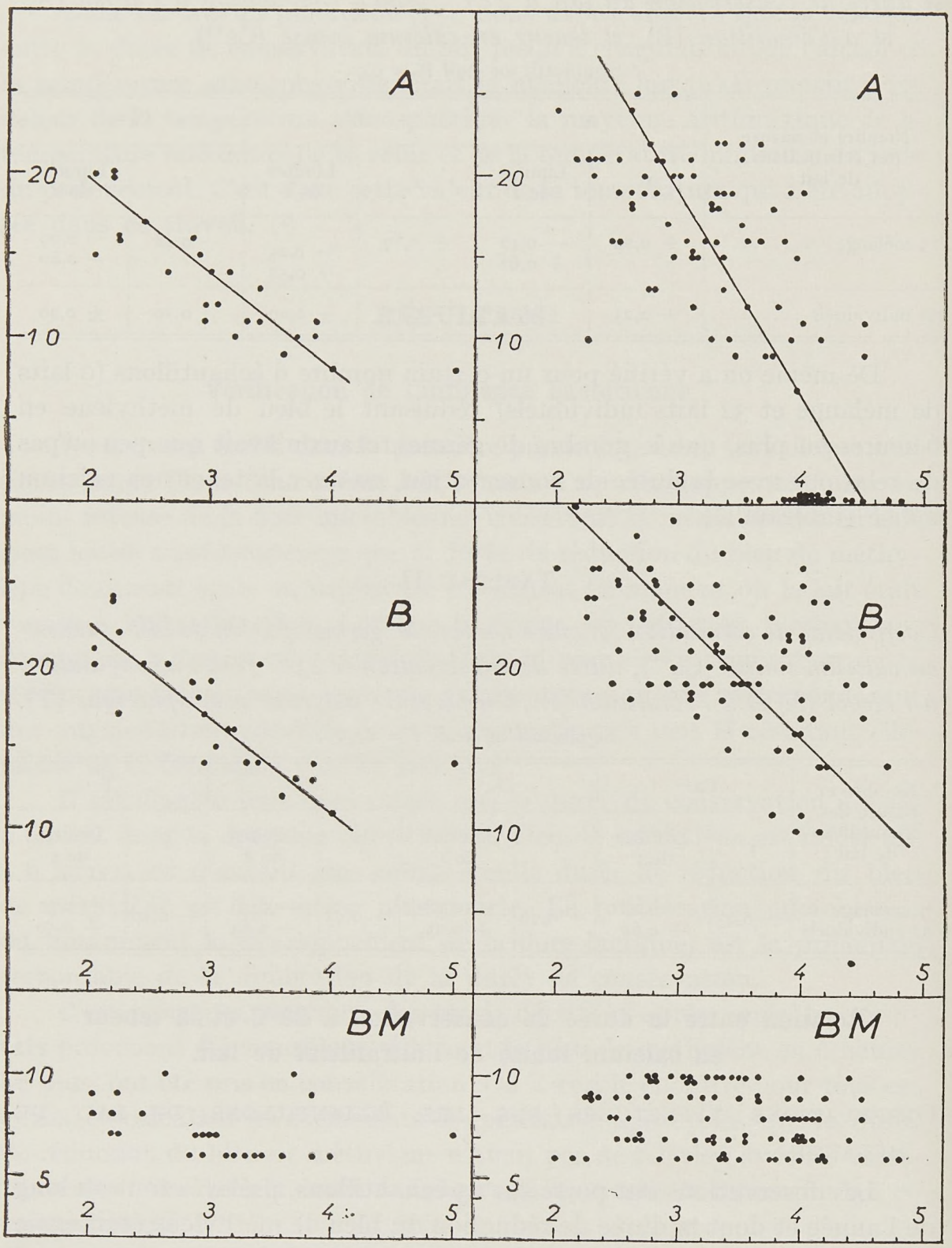


FIG. 1. — Relation entre teneur en calcium ionisé et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool (A) et à l'ébullition (B) et durée de réduction du bleu de méthylène (BM).
En ordonnée : durée en heures.
En abscisse : calcium ionisé en mM/l.

On voit que la corrélation est assez étroite entre la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation jusqu'à coagulation par l'alcool et que la corrélation est moins bonne pour la durée de conservation jusqu'à coagulation par l'ébullition. Pour les laits de mélange la marge des variations observées (fig. 1) s'étend en moyenne, de 2 à 4 mM/litre de calcium ionisé, de 8 à 20 heures pour la coagulation à l'alcool et de 11 à 24 heures pour la coagulation à l'ébullition. Il faut noter qu'aucun des échantillons examinés n'a coagulé à l'alcool aussitôt après le prélèvement comme cela avait été parfois observé lors des contrôles effectués en laiterie.

Observations effectuées sur les laits individuels.

On dispose des mêmes données que celles recueillies pour le lait de mélange. Les résultats sont indiqués dans le tableau V et sur la figure 1.

Les coefficients de corrélation sont donnés dans le tableau IV.

Comme pour les laits de mélange, on voit que plus la teneur en calcium ionisé est élevée, plus les durées de conservation sont courtes. Les relations entre la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation sont les mêmes qu'avec les laits de mélange, mais plus lâches, 26 p. 100

Tableau III

Résultats obtenus avec les laits de mélange.

A : Durée de conservation du lait à 23°C (en heures) jusqu'à coagulation par l'alcool.
B : Durée de conservation du lait à 23°C (en heures) jusqu'à coagulation par l'ébullition.
BM : Durée de réduction (en heures) du bleu de méthylène.
Log *n* : Logarithme du nombre de germes par ml de lait.
Ca^{++} : Teneur en calcium ionisé en mM/litre.
T : Température moyenne atmosphérique en °C.

A	B	BM	Log n	Ca^{++}	T
20	24	7	—	2,20	5,0
20	21	8	—	2,05	5,0
20	24	8	—	2,20	4,0
17	20	8	—	2,45	6,8
16	22	7	—	2,25	7,0
16	17	9	—	2,25	6,1
16	19	6	—	2,85	13,7
15	18	7	—	2,90	12,0
15	20	9	—	2,05	5,3
14	19	7	4,60	3,00	12,5
14	16	6	5,80	3,15	12,4
14	20	10	5,65	2,65	5,0
13	20	6	5,75	3,40	9,6
12	14	7	5,40	2,95	10,0
12	15	7	5,65	3,05	8,7
11	14	6	—	3,30	13,7
11	14	6	6,20	3,40	14,0
11	17	6	6,30	2,95	5,6
11	14	9	—	3,85	16,0
10	13	6	—	3,85	16.0
10	16	6	6,00	3,20	11,3
10	13	10	—	3,70	14,5
9	12	6	—	3,60	13,7
8	11	6	—	4,00	14,4
8	14	7	—	5,00	16,1

TABLEAU IV

Coefficients de corrélation (r) *entre teneur en calcium ionisé* (Ca^{++}) *et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool* (A) *et à l'ébullition* (B).

(Significatif au seuil P = 0,95)

Nombre et nature des échantillons de lait	A		B	
	r	Limites de r	r	Limites de r
25 laits de mélange	— 0,84	— 0,69 — 0,92	— 0,75	— 0,52 — 0,87
94 laits individuels	— 0,76	± 0,08	— 0,54	± 0,15

des échantillons de laits individuels examinés coagulent spontanément par l'alcool. Ces 26 p. 100 proviennent en majorité de vaches en fin de lactation. La figure 1 montre que tous les laits individuels coagulant à l'alcool dès la traite ont une teneur en calcium ionisé supérieure à 3,5 mM/litre. Parmi les 104 échantillons de laits individuels réduisant le bleu de méthylène en plus de 6 heures, 10 présentaient une réaction de Whiteside nettement positive. Les résultats relatifs à ces 10 échantillons n'ont pas été pris en ligne de compte dans les calculs.

OBSERVATIONS CONCERNANT CHACUNE DES VACHES.

Dans le tableau V on a indiqué les résultats obtenus avec chacune des 23 vaches. Sur la figure 2 on a reporté seulement les résultats concernant 18 vaches dont le lait a fait l'objet d'au moins 3 examens au cours desquels l'épreuve de Whiteside était négative et la durée de réduction du bleu de méthylène supérieure à 6 heures.

Les examens chimique et bactériologique effectués du début à la fin de la lactation nous ont conduit aux résultats suivants en ce qui concerne :

1. — *La relation entre la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation par l'alcool*, chez 10 vaches (Radieuse, Accueillante, Carmina, Quinine, Tanaisie, Biscotte, Banquise, Séville, Mimosa) la durée de conservation est d'autant plus courte que la teneur en calcium ionisé est plus élevée ; chez 2 vaches (Capricieuse, Tartine) cette relation existe, mais elle est très lâche ; chez 6 vaches (Tartinette, Taquine, Alouette, Udine, Filoute, Vénus), il n'existe aucune relation.

2. — *La relation entre la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation à l'ébullition*, chez 9 vaches (Accueillante, Carmina, Orangère, Tanaisie, Biscotte, Banquise, Taquine, Filoute) la durée de conservation est d'autant plus courte que la teneur en calcium

Tableau V

Résultats obtenus avec les laits individuels.

A : Durée de conservation du lait à 23°C (en heures) jusqu'à coagulation à l'alcool.
B : Durée de conservation du lait à 23°C (en heures) jusqu'à coagulation à l'ébullition.
BM : Durée de réduction (en heures) du bleu de méthylène.
Log *n* : Logarithme du nombre de germes par ml de lait.
Ca^{++} : Teneur en calcium ionisé en mM /litre.
T : Température moyenne atmosphérique en °C.

Nom de la Vache	Stade de lactation	A	B	BM	log *n*	Ca^{++}	T
Sablaise	I	21	24	9	—	2,25	6,10
	I	19	21	10	—	2,80	16,00
Tartinette ..	I	21	29	9	4,60	3,50	10,80
	I	19	22	9	4,00	3,90	10,00
	I	18	21	7	—	3,30	13,70
	I	7	10	7	—	3,95	14,40
	II	0	26	8	5,15	4,00	5,60
	II	0	25	7	4,73	4,00	7,35
	II	0	22	7	4,05	4,00	6,75
	II	0	21	8	—	3,85	8,70
	II	0	20	6	—	4,20	16,00
	II	0	19	9	—	3,65	16,20
	II	0	14	6	—	4,20	11,30
Carmina ...	II	25	28	7	4,15	2,65	7,35
	II	19	23	7	—	2,60	14,55
	II	16	19	9+++	4,90	2,80	6,75
	I	10	15	8	—	3,90	14,40
Quinine	I	32	34	8+++	—	1,90	5,30
	II	21	25	8	—	2,50	12,00
	II	20	24	10	—	3,10	13,70
	II	18	22	8	—	2,60	13,70
	I	16	20	10	—	3,65	12,50
	II	15	16	8	—	3,95	14,40
Filoute.....	I	21	26	9	—	2,30	6,10
	I	16	19	10	—	3,05	16,00
	I	10	23	6	—	2,25	5,30
	II	0	28	10++	5,45	4,25	5,00
Capricieuse .	I	22	27	9	4,80	3,65	12,50
	I	18	23	7	—	3,75	13,70
	I	12	15	6	—	3,80	13,70
	II	9	11	6	—	3,75	15,30
Udine.....	I	22	27	10	4,00	3,35	12,50
	II	18	22	7	—	3,25	6,80
	II	17	19	6	—	3,50	15,30
	I	15	17	7	—	3,15	18,00
Tartine	II	13	18	6	—	3,35	12,00
	II	10	15	6	—	3,40	13,70
	II	10	14	6	—	4,15	12,00
Banquise ...	I	24	26	6	—	2,00	5,30
	I	21	26	9	—	2,35	6,10
	I	16	19	8	—	2,45	11,30
Solamine ...	I	23	29	10+++	4,60	3,20	9,60
	I	13	25	10	—	2,80	14,55
	II	21	25	10	5,10	2,80	10,80
	II	17	24	8+++	4,60	2,85	10,00
	II	13	19	10+++	—	3,20	14,00
	II	0	9	10+++	—	3,12	6,60
Orangère ...	I	22	26	10	4,00	2,75	10,00
	I	22	25	10	4,00	3,30	12,59
	II	19	20	7	—	3,45	13,70

Nom de la Vache	Stade de lactation	A	B	BM	log *n*	Ca—	T
Tanaisie....	I	20	23	7	—	2,70	6,60
	I	19	21	9	4,00	3,30	12,40
	I	16	20	7	—	3,85	16,00
	II	11	18	6	—	4,00	15,30
	II	0	14	6	—	4,65	16,20
Biscotte	II	24	26	9	—	2,60	6,10
	II	21	30	6	—	2,15	5,30
	I	18	20	10	—	3,25	12,50
	II	0	17	6	6,15	4,00	6,75
	II	0	16	10	5,40	3f55	5,60
Séville	I	21	25	10	5,90	3,10	10,80
	I	15	20	8	—	2,95	13,70
	I	15	18	10	5,10	3,10	10,00
	II	15	18	6	—	3,10	11,30
	II	9	22	8	—	3,70	16,20
	II	0	22	6	4,80	4,80	5,60
Accueillante.	II	19	22	7	—	4,00	11,30
	II	11	22	8	—	4,50	16,60
	II	9	17	6	—	4,50	16,00
	II	0	19	9	—	4,50	16,20
Mimosa	I	17	19	7	—	2,90	15,30
	I	16	23	7	—	3,30	16,00
	II	15	20	6	—	3,35	6,80
	II	0	21	8	5,85	4,05	8,30
	II	0	10	8	5,70	4,15	5,00
Alouette ...	II	25	29	10	4,70	2,95	5,00
	I	20	24	9	—	2,30	9,00
	II	20	23	9	4,00	2,95	10,00
	II	18	19	10	4,30	2,60	7,50
	II	16	21	9	—	2,50	12,50
	II	13	19	9	—	2,75	18,00
Chypre	I	20	21	9+	4,50	3,45	12,40
	I	19	23	7	—	2,70	6,60
	II	16	18	8+	—	3,45	18,00
Tempête ...	II	16	19	9	4,60	3,20	12,40
	II	16	19	7	—	3,55	11,30
Taquine	II	21	24	6	—	2,85	10,00
	II	20	22	6	—	3,00	18,00
	I	19	25	7	—	2,50	6,60
	I	19	21	10	4,70	3,35	12,40
	I	16	18	6++	—	3,20	15,00
	II	10	19	8	—	3,25	6,80
Radieuse ...	I	12	22	7	—	3,55	6,60
	I	12	21	9	5,15	3,10	12,40
	I	0	24	8	—	4,10	18,00
	II	0	22	6	—	3,90	6,80
	II	0	16	7	—	4,00	15,30
	II	0	2	10	—	4,40	10,00
Vénus	II	0	24	9	4,80	4,20	12,50
	II	0	19	7	—	4,40	16,20
	II	0	17	7	—	4,10	11,30
	II	0	11	9	—	4,00	12,50
Vedette	II	22	28	10	4,80	3,50	12,50
	II	9	19	10	—	3,45	12,50

Note. — Les résultats correspondant à des laits positifs à l'épreuve de Whiteside (+, ++ et +++) sont éliminés des calculs.

Le chiffre I indique que la vache est dans la première et le chiffre II dans la deuxième moitié de lactation au moment du prélèvement.

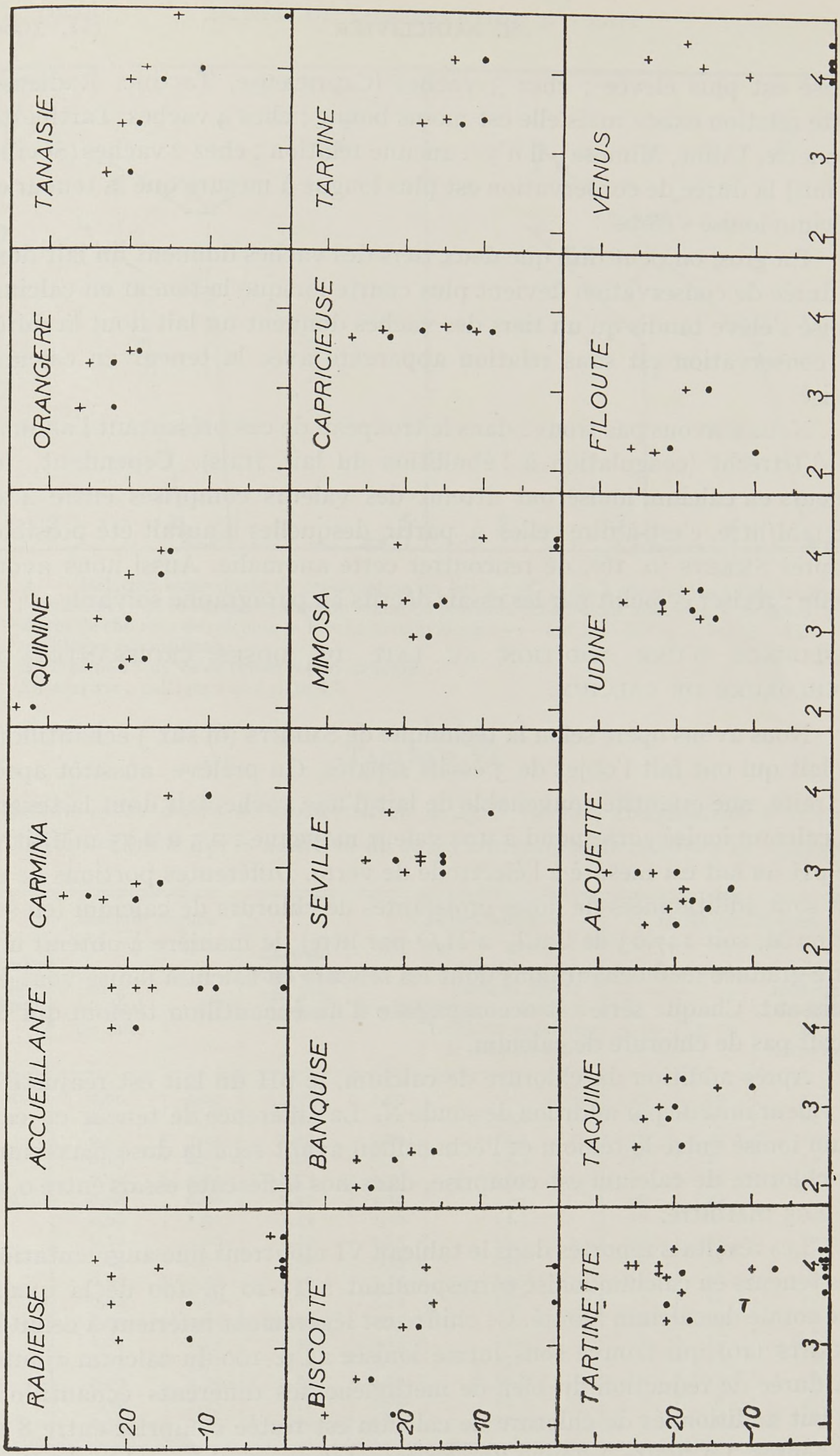


FIG. 2. — Relation entre teneur en calcium ionisé et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool (o) et à l'ébullition (+).

En ordonnée : durée de conservation en heures.
En abscisse : calcium ionisé en mM/l.

ionisé est plus élevée ; chez 3 vaches (Capricieuse, Tartine, Radieuse) cette relation existe mais elle est moins bonne ; chez 4 vaches (Tartinette, Alouette, Udine, Mimosa), il n'y a aucune relation ; chez 2 vaches (Séville, Vénus) la durée de conservation est plus longue à mesure que la teneur en calcium ionisé s'élève.

En gros, on peut dire que deux tiers des vaches donnent un lait dont la durée de conservation devient plus courte lorsque la teneur en calcium ionisé s'élève tandis qu'un tiers des vaches donnent un lait dont la durée de conservation est sans relation apparente avec la teneur en calcium ionisé.

Nous n'avons pas trouvé dans le troupeau de cas présentant l'anomalie d'Utrecht (coagulation à l'ébullition du lait frais). Cependant, les teneurs en calcium ionisé ont atteint des valeurs comprises entre 4 et 4,8 mM/litre, c'est-à-dire celles à partir desquelles il aurait été possible, d'après Smeets (6, 16), de rencontrer cette anomalie. Aussi nous avons voulu préciser ce point par les essais décrits au paragraphe suivant.

Influence d'une addition au lait de doses croissantes de chlorure de calcium.

Nous avons opéré selon la technique de Smeets (6) sur 3 échantillons de lait qui ont fait l'objet de 3 essais séparés. On prélève, aussitôt après la traite, une quantité convenable de lait d'une vache, lait dont la teneur en calcium ionisé correspond à une valeur moyenne : 2,3 à 2,75 mM/litre. Le pH du lait est mesuré à l'électrode de verre. Différentes portions de ce lait sont additionnées de doses croissantes de chlorure de calcium (en solution M, soit 147,03 de $CaCl_2$, 2 H_2O par litre) de manière à obtenir une série graduée de 6 échantillons dont les teneurs en calcium ionisé vont en croissant. Chaque série est accompagnée d'un échantillon témoin qui ne reçoit pas de chlorure de calcium.

Après addition du chlorure de calcium, le pH du lait est réajusté à sa valeur initiale par addition de soude N. La différence de teneur en calcium ionisé entre le témoin et l'échantillon ayant reçu la dose maximum de chlorure de calcium est comprise, dans nos différents essais entre 0,95 et 2,05 mM/litre.

Les résultats reportés dans le tableau VI montrent une augmentation des teneurs en calcium ionisé correspondant à 15-20 p. 100 de la quantité totale de calcium ajouté. Ce chiffre est légèrement inférieur à celui de Smeets (16) qui trouve sous forme ionisée 25 p. 100 du calcium ajouté. La durée de réduction du bleu de méthylène des différents échantillons de lait additionnés de chlorure de calcium est restée comprise entre 8 et 10 heures. La figure 3 donne une représentation graphique des résultats du tableau VI relatifs à la durée de conservation jusqu'à coagulation par l'alcool et par l'ébullition. On voit que cette durée devient de plus en

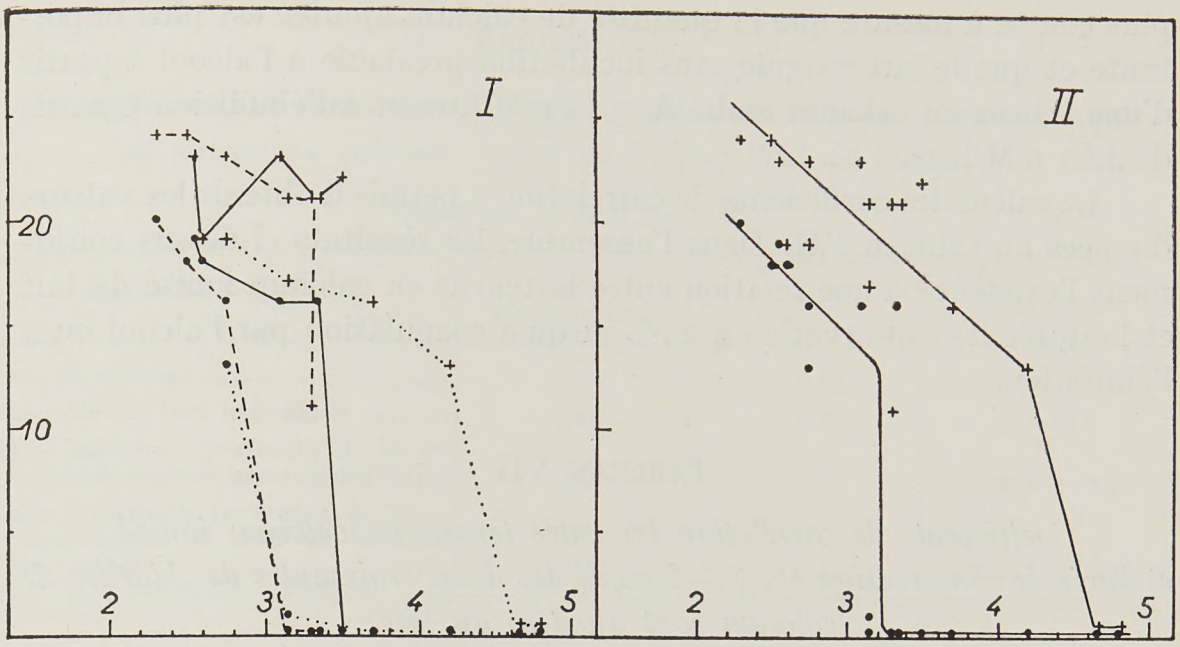


FIG. 3. — Relation entre durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool (o) et à l'ébullition (+), et teneur en calcium ionisé de plusieurs échantillons additionnés de doses croissantes de chlorure de calcium — I — Laits individuels (—— lait 1. --- lait 2, ... lait 3) — II — Ensemble des échantillons.
En ordonnée : durée de conservation en heures.
En abscisse : calcium ionisé en mM/l.

TABLEAU VI

Relation entre durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation et teneur en calcium ionisé après addition de doses croissantes de chlorure de calcium.

Numéro de l'essai	Calcium ajouté		Calcium total en g par litre de lait	Calcium ionisé		Durée (en heures)		
	en g par litre de lait	en *m*M/l		en *m*M/l	proportion du calcium ajouté retrouvé dans l'ultrafiltrat sous forme de calcium ionisé	de conservation		de réduction du bleu de méthylène
						A (1)	B (2)	
1	0,00	0,00	1,30	2,60	—	18	19	10
	0,07	1,75	1,37	2,55	0,0	19	23	10
	0,13	3,25	1,43	3,10	15,5	16	23	10
	0,19	4,75	1,49	3,33	15,3	16	21	10
	0,23	5,75	1,53	3,50	15,7	0	22	10
2	0,00	0,00	1,37	2,30	—	20	24	9
	0,06	1,50	1,43	2,50	13,3	18	24	10
	0,12	3,00	1,49	2,75	15,0	16	23	10
	0,17	4,25	1,54	3,35	24,6	0	21	10
	0,22	5,50	1,59	3,15	15,5	0	21	8
	0,24	6,00	1,61	3,30	16,7	0	11	10
3	0,00	0,00	1,40	2,75	—	13	19	8
	0,07	1,75	1,47	3,15	23,0	1	17	8
	0,15	3,75	1,55	3,70	25,2	0	16	8
	0,19	4,75	1,59	4,20	30,5	0	13	8
	0,31	7,75	1,71	4,65	24,5	0	0	8
	0,39	9,75	1,79	4,80	21,0	0	0	8

(1) Jusqu'à coagulation par l'alcool.
(2) Jusqu'à coagulation par l'ébullition.

plus courte à mesure que la quantité de calcium ajoutée est plus importante et que le lait coagule sans incubation préalable à l'alcool à partir d'une teneur en calcium ionisé de 3,15 mM/litre et à l'ébullition à partir de 4,65 mM/litre.

Le calcul des coefficients de corrélation a permis d'obtenir les valeurs données au tableau VII. Dans l'ensemble, les résultats ci-dessus confirment l'existence d'une relation entre la teneur en calcium ionisé du lait et la durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation par l'alcool ou à l'ébullition.

TABLEAU VII

Coefficients de corrélation (r) *entre teneur en calcium ionisé et durée de conservation à 23°C, lorsque des doses croissantes de chlorure de calcium sont ajoutées au lait.*

(Significatif au seuil P = 0,95)

Nombre d'échantillons	Relation avec la durée de conservation jusqu'à coagulation			
	Par l'alcool		Par l'ébullition	
	r	Limites de r	r	Limites de r
17	— 0,78	— 0,92 â — 0,49	— 0,81	— 0,93 à — 0,54

TABLEAU VIII

Coefficients de corrélation (r) *entre température atmosphérique et durée de réduction du bleu de méthylène.*

(Significatif au seuil P = 0,95)

Nombre d'échantillons de lait	r	Limites de r
25 mélange	— 0,36	0 à — 0,64
94 individuels	0	± 0,20

Autres relations.

On a cherché les relations qui pouvaient exister entre la teneur en calcium ionisé et d'autres facteurs susceptibles d'influer sur la coagulation du lait.

C'est ainsi que nous avons calculé les coefficients de corrélation entre température moyenne atmosphérique, teneur en calcium ionisé et durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation (tableaux IX et X, fig. 4). Comme

Tableau IX

Coefficients de corrélation (r) *entre température moyenne atmosphérique et teneur en calcium ionisé de l'ultrafiltrat de lait.*

(Significatif au seuil P = 0,95)

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons	r	Limites de r
Laits de mélange	25	+ 0,83	+ 0,67 à + 0,92
Ensemble des laits individuels	94	+ 0,16	± 0,19
Laits individuels provenant de la 1re moitié du stade de lactation des vaches	38	+ 0,61	+ 0,39 à + 0,76
Laits individuels provenant de la seconde moitié du stade de lactation des vaches	56	+ 0,12	— 0,14 à + 0,35

Tableau X

Coefficients de corrélation (r) *entre température atmosphérique et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool* (A) *et à l'ébullition* (B).

(Significatif au seuil P = 0,95)

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons	A		B	
		r	limites de *r*	*r*	limites de *r*
Laits de mélange	25	— 0,72	— 0,49 — 0,86	— 0,75	— 0,52 — 0,88
Ensemble des laits individuels	94	— 0,13	± 0,19	— 0,33	± 0,17
Laits individuels provenant de la 1re moitié du stade de lactation des vaches	38	— 0,44	— 0,17 — 0,65	— 0,46	— 0,19 — 0,66
Laits individuels provenant de la 2e moitié du stade de lactation des vaches	56	+ 0,13	— 0,12 + 0,37	— 0,23	— 0,45 + 0,01
Laits individuels provenant exclusivement des 2e et 3e mois de lactation des vaches.....	253	— 0,55	± 0,08	— 0,64	± 0,07

précédemment, on a d'abord vérifié que la qualité bactériologique des échantillons de lait, mesurée par la durée de réduction du bleu de méthylène et par le nombre de germes, n'avait pas de relation avec les variations de la température atmosphérique. C'est ce que montrent les coefficients de corrélation indiqués dans les tableaux II et VIII et les figures 4 et 5.

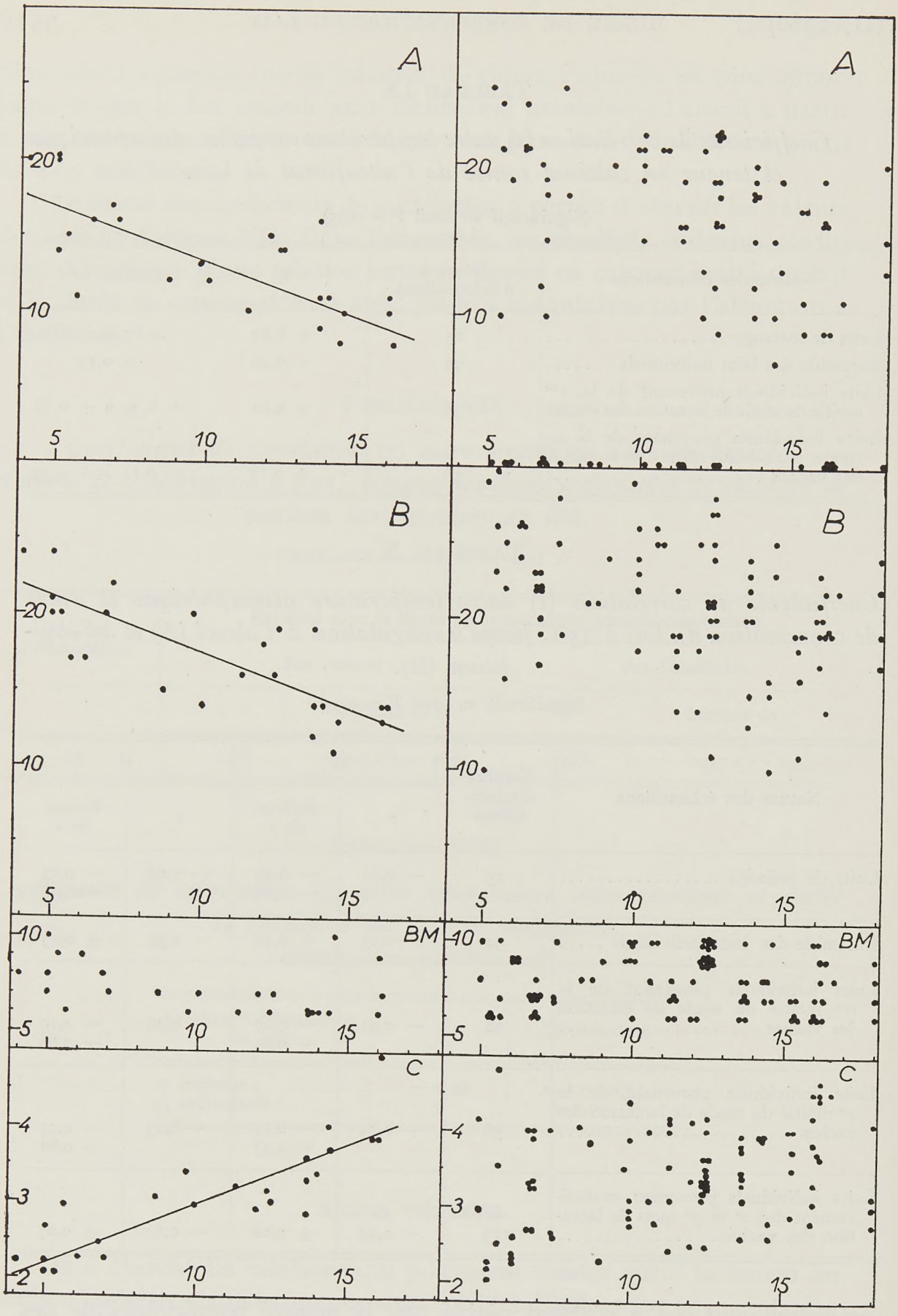


FIG. 4. — Relation entre température atmosphérique et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool (A) et à l'ébullition (B), durée de réduction du bleu de méthylène (BM), teneur en calcium ionisé (C).

En ordonnée : C = Ca^{++} en mM/l.
A, B, BM = durée en heures.
En abscisse : Température moyenne et atmosphérique en °C.

RELATION ENTRE LA TEMPÉRATURE ATMOSPHÉRIQUE ET LA TENEUR EN CALCIUM IONISÉ DU LAIT.

Dans le cas des laits de mélange, on constate (tableau IX) une relation entre la température atmosphérique et la teneur en calcium ionisé (fig. 4, C à gauche). Dans le cas des laits individuels (fig. 4, C à droite)

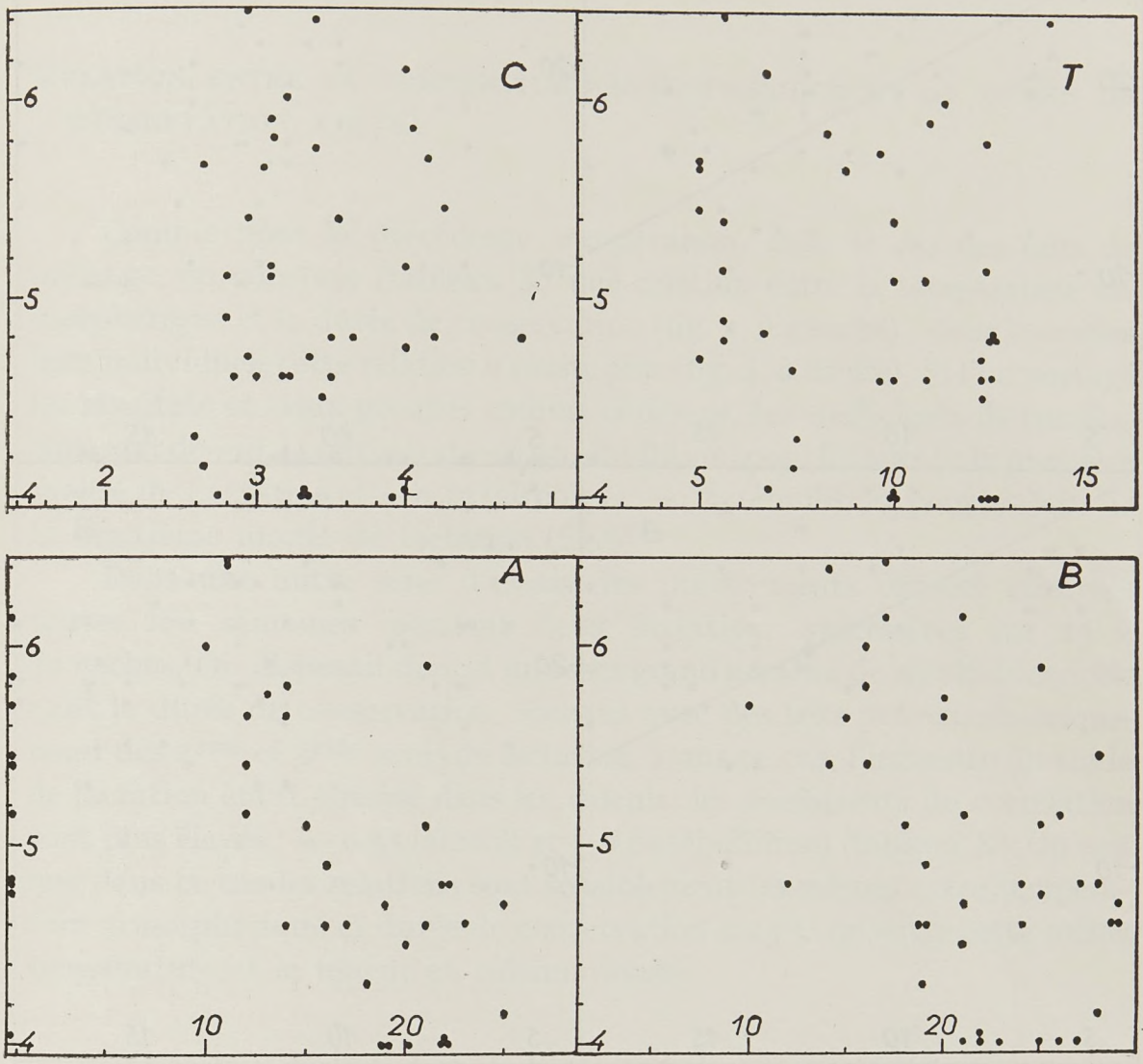


FIG. 5. — Relation entre nombre de germes du lait et teneur en calcium ionisé (C), température moyenne atmosphérique (T), durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool (A) et à l'ébullition (B).
En ordonnée : Logarithme du nombre de germes par ml de lait.
En abscisse : C = Calcium ionisé en mM/l. T : Température atmosphérique en °C.
A, B = Durée de conservation en heures.

cette relation n'existe plus. Mais si on partage les résultats en deux groupes : l'un constitué par les laits de vaches dans la première moitié de leur lactation (groupe I du tableau V), l'autre constitué par les laits de vaches dans la deuxième moitié de leur lactation (groupe II du tableau V), on constate que le coefficient de corrélation entre température atmosphérique et calcium ionisé dans la première moitié de la lactation est + 0,61 alors que le coefficient est de + 0,12 pour les laits de la deuxième moitié de lactation (C, fig. 6 et tableau XI).

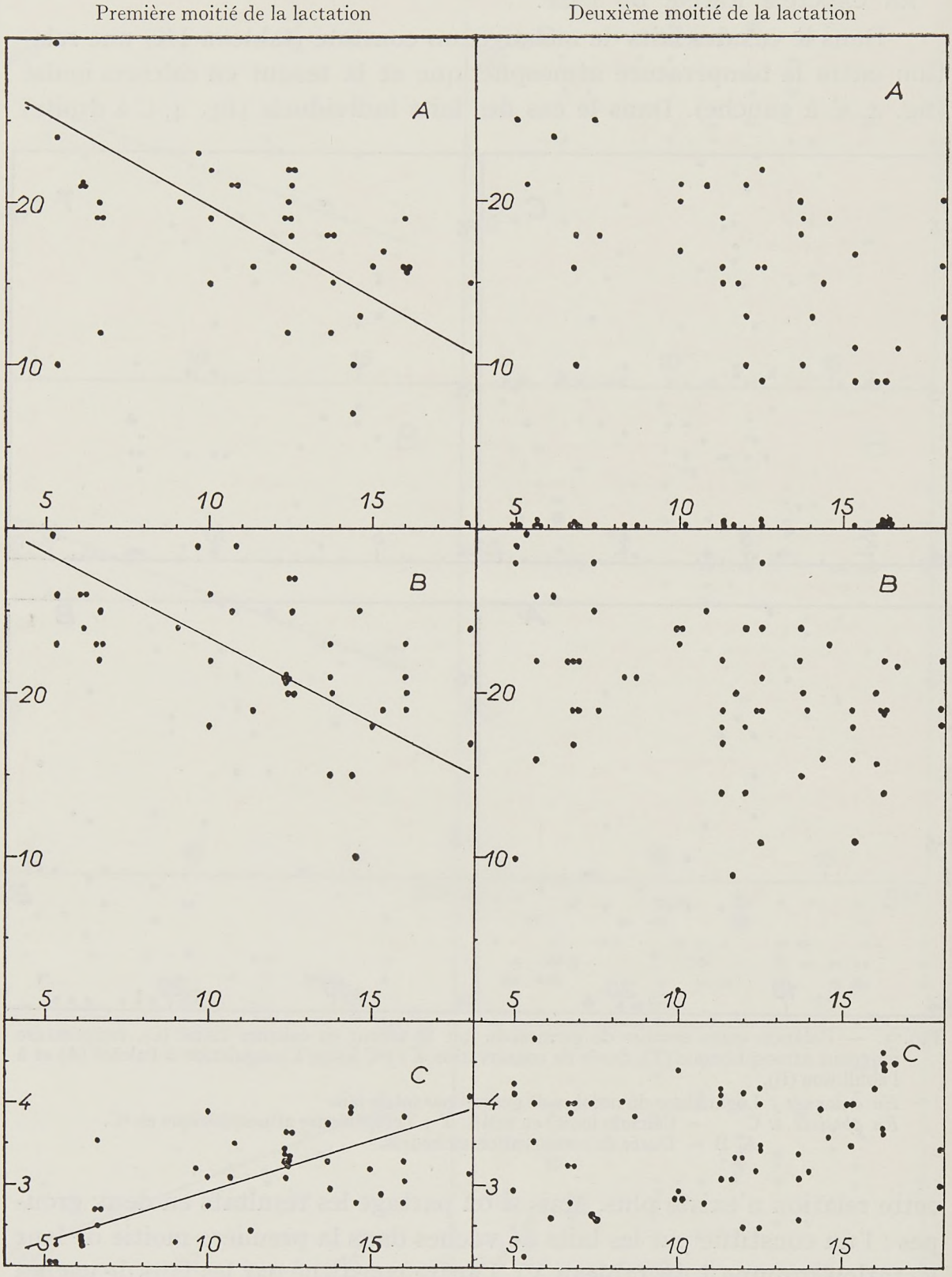


FIG. 6. — Relation entre température moyenne atmosphérique et durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool (A) et à l'ébullition (B) et teneur en calcium ionisé (C).
En ordonnée : C = Ca^{++} en mM/litre.
A, B = Durée de conservation en heures.
En abscisse : Température moyenne atmosphérique en °C.

Pour éliminer totalement l'influence éventuelle du stade de lactation des vaches, il faudrait ne tenir compte que des résultats obtenus pendant les 2eme et 3eme mois des lactations des vaches. Nous n'avons pas effectué un nombre suffisant de prélèvements pendant cette période pour interpréter statistiquement les résultats.

Relation entre la température atmosphérique et la durée de conservation a 23°C.

Comme pour la précédente comparaison, dans le cas des laits de mélange, on constate (tableau X) une relation entre la température atmosphérique et la durée de conservation (fig. 4, à gauche) ; dans le cas des laits individuels cette relation n'existe plus (fig. 4, à droite). Si l'on partage les résultats en deux groupes comme ci-dessus, les coefficients de corrélation sont de— 0,44 (alcool) et — 0,46 (ébullition) pour les laits de la première moitié de l'actation et — 0,13 (alcool) et —0,23 (ébullition) pour les laits de la deuxième moitié de lactation (fig.6).

Dans une autre série d'essais, les prélèvements ont été effectués toutes les semaines pendant deux lactations successives sur 15 à 20 vaches. On disposait donc d'un assez grand nombre de résultats concernant la durée de conservation, obtenus avec des laits provenant uniquement des 2eme et 3eme mois de lactation. Dans ce cas, l'influence du stade de lactation étant éliminé dans les calculs, les coefficients de corrélation sont plus élevés : — 0,55 (alcool) et— 0,64 (ébullition) (tableau X). On voit que dans ce cas les relations sont sensiblement les mêmes entre température atmosphérique et durée de conservation à 23°C qu'entre cette même température et la teneur en calcium ionisé.

Relation entre la durée de conservation a 23°C et la teneur du lait en constituants azotés ou minéraux.

Le tableau XI et la figure 7 indiquent, pour 31 échantillons de laits individuels les teneurs en calcium ionisé, calcium total, azote total et azote de la caséine, le rapport du calcium total à l'azote total et le taux de calcium ionisé p. 100 du calcium total. Le tableau XII indique les coefficients de corrélation.

On voit qu'il y a une relation entre le taux de calcium ionisé p. 100 du calcium total et les durées de conservation. Par contre, il n'y a pas de relation entre durées de conservation et calcium total, azote total, azote de la caséine et rapport calcium total/azote total.

DISCUSSION

Une observation préalable doit être faite concernant la qualité bactériologique du lait appréciée par le nombre de germes et par la durée de réduction du bleu de méthylène. L'examen des tableaux III et V et celui de la figure 1 montre que pour des laits de mélange réduisant le bleu de méthylène en 6 heures et plus, on observe, en toutes saisons des durées de conservation à 23°C jusqu'à coagulation par l'ébullition comprises entre 11 et 24 heures, soit une moyenne de 17,1 heures. Dans les mêmes conditions d'expérience MATTICK et al. (8,17) trouvent des durées de conservation comprises entre 14,5 heures et 38 heures. On peut

TABLEAU XI

Résultats obtenus avec des laits individuels.

A : Durée de conservation du lait à 23°C (en heures) jusqu'à coagulation par l'alcool.
B : Durée de conservation du lait à 23°C (en heures) jusqu'à coagulation par l'ébullition.
CaT : Teneur en calcium total.
Ca^{++} : Teneur en calcium ionisé.
NT : Teneur en azote total.
NC : Teneur en azote caséine.
BM : Durée de réduction (en heures) du bleu de méthylène.

A	B	Quantités exprimées en g par l				$\frac{NC}{NT} \times 100$	$\frac{Ca^{++}}{CaT} \times 100$	$\frac{CaT}{NT}$	BM
		CaT	Ca^{++}	NT	NC				
21	23	1,103	0,132	4,501	3,404	75,6	12,00	0,245	10
20	24	1,371	0,092	6,034	4,910	81,3	6,70	0,228	9
20	23	1,381	0,107	5,203	4,181	80,3	7,75	0,265	7
20	21	1,297	0,108	6,048	5,004	82,7	8,30	0,214	8
19	23	1,220	0,107	5,837	4,728	81,0	8,75	0,210	7
19	25	1,366	0,099	6,108	5,088	83,3	7,20	0,227	7
19	20	1,499	0,138	5,768	4,529	78,5	9,20	0,260	7
19	20	1,227	0,126	4,991	3,891	77,9	10,25	0,246	10
19	21	1,232	0,152	5,565	4,402	79,1	12,40	0,222	10
18	19	1,306	0,104	6,010	4,808	80,0	7,95	0,216	10
18	21	1,366	0,132	5,789	4,598	79,4	9,60	0,238	7
18	23	1,395	0,150	5,642	4,570	80,9	10,75	0,247	7
18	20	1,252	0,110	5,250	4,220	80,3	8,80	0,238	10
16	19	1,351	0,114	5,726	4,488	78,5	8,50	0,236	6
16	21	1,321	0,140	6,230	5,113	82,0	10,50	0,212	9
16	21	1,386	0,154	5,544	4,541	81,9	11,20	0,250	7
16	23	1,485	0,132	6,384	5,124	80,2	8,90	0,232	7
16	19	1,356	0,122	5,866	4,543	77,4	9,00	0,232	10
16	18	1,173	0,138	4,998	3,933	78,6	11,75	0,235	8
15	20	1,235	0,118	5,586	4,368	78,1	9,60	0,221	8
15	17	1,192	0,126	4,835	3,868	80,0	10,70	0,245	7
14	19	1,311	0,160	5,446	4,339	79,6	12,20	0,242	7
13	15	1,300	0,154	5,551	4,441	80,0	11,80	0,234	6
12	22	1,257	0,142	6,011	4,996	83,1	11,20	0,210	7
11	23	1,289	0,180	4,910	3,854	78,4	14,00	0,262	8
11	14	1,336	0,126	5,832	4,304	79,2	9,50	0,246	9
9	19	1,658	0,178	6,496	5,340	82,2	10,75	0,257	10
9	17	1,292	0,180	5,152	4,094	79,4	14,00	0,251	6
0	9	1,292	0,185	—	4,533	—	14,31	—	7
0	11	1,393	0,200	5,894	4,676	79,5	14,30	0,236	9
0	24	1,237	0,184	5,054	4,058	80,2	14,85	0,234	8

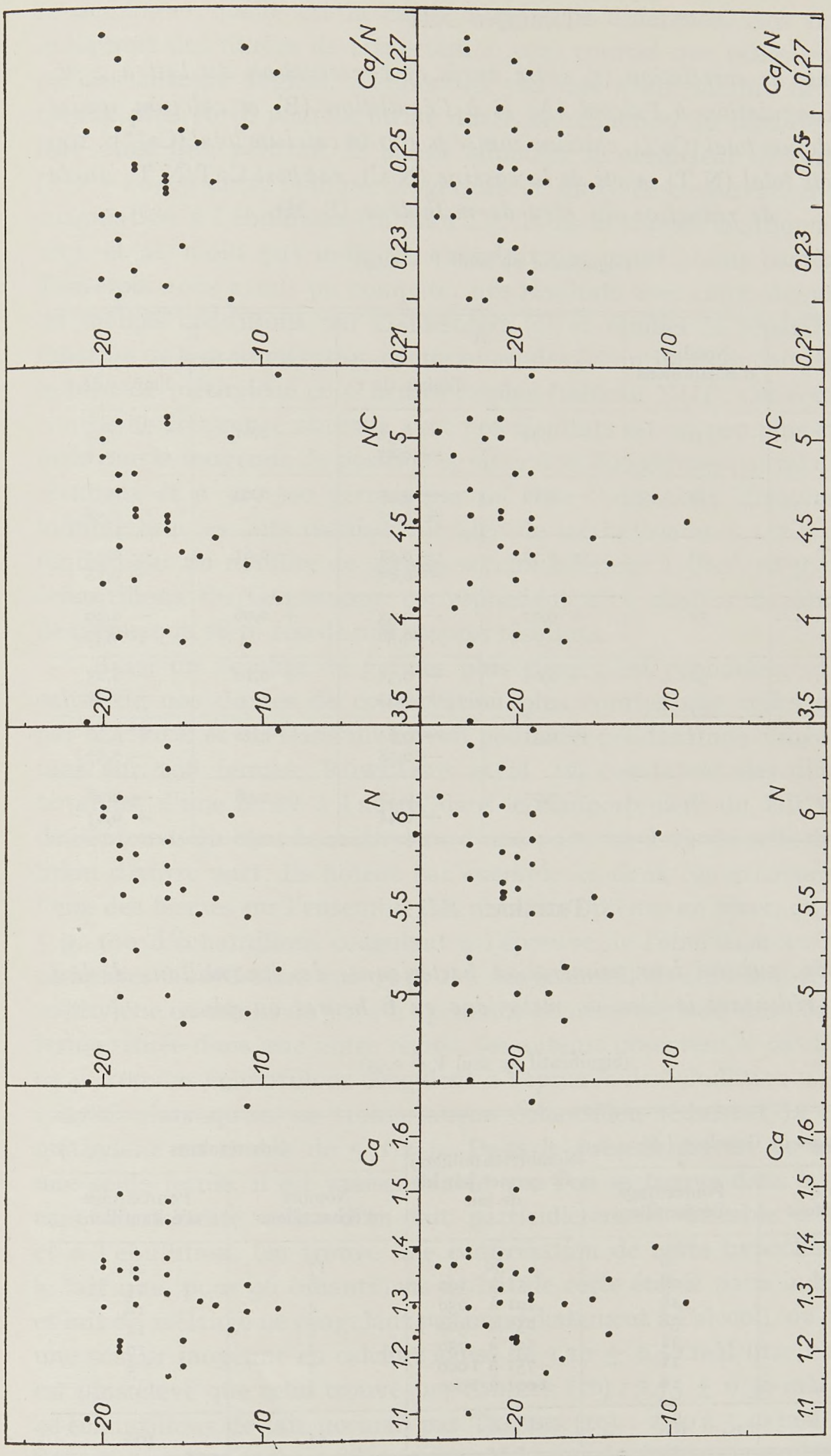


FIG. 7. — Relation entre durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool et à l'ébullition, et teneur en calcium total (Ca), teneur en azote total (N), teneur en azote de la caséine (NC), rapport calcium total/azote total(Ca/N).

En ordonnée : Durée de conservation (en heures) jusqu'à coagulation à l'alcool, à l'ébullition.
En abscisse : Ca = Calcium total en g par litre.
N = Azote total en g par litre.
NC = Azote caséine en g par litre.
Ca/N = Rapport Calcium total/Azote total.

Tableau XII

Coefficients de corrélation (r) *entre durée de conservation du lait à 23°C jusqu'à coagulation à l'alcool* (A) *et à l'ébullition* (B) *et calcium ionisé* (Ca^{++}), *calcium total* (CaT), *calcium ionisé p.* 100 *du calcium total* (Ca^{++} p. 100 CaT), *azote total* (N T), *azote de la caséine* (N C), *rapport* CaT/N T, *durée de réduction du bleu de méthylène* (B M).

(Significatif au seuil P = 0,95)

	Nombre d'échantillons	A		B	
		r	limites de r	r	limites de r
Ca^{++}	31	— 0,72	— 0,50 — 0,85	— 0,61	— 0,34 — 0,78
CaT	31	— 0,12	— 0,45 + 0,23	+ 0,04	— 0,31 + 0,38
Ca^{++} % CaT	31	— 0,73	— 0,51 — 0,85	— 0,61	— 0,34 — 0,78
NT	31	+ 0,02	— 0,33 + 0,36	+ 0,06	— 0,29 + 0,39
NC	31	— 0,01	— 0,35 + 0,33	+ 0,10	— 0,25 + 0,42
CaT/NT	31	— 0,31	— 0,04 — 0,58	— 0,20	+ 0,16 — 0,57
BM	31	+ 0,05	— 0,32 + 0,44	+ 0,08	— 0,28 + 0,47

Tableau XIII

Répartition, suivant leur numération bactérienne, des échantillons de lait réduisant le bleu de méthylène en 6 *heures ou plus.*

(Significatif au seul P = 0,95)

Résultats de Galesloot (18)		Nombre (en milliers) de germes par ml de lait	Nos résultats	
Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons		Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons
4	6	50	17	41
13	18	51 à 100	6	15
12	16	101 à 250	4	10
28	38	251 à 500	5	12
8	11	501 à 750	4	10
8	11	751 à 1000	2	5
0	0	1001 à 2000	3	7
73	100		41	100

se demander quelle est la cause d'une telle différence. Nos résultats, indiquant des durées de conservation plus courtes que celles observées par les auteurs anglais, n'étaient-ils pas dus à un nombre de germes totaux plus élevé pour la même durée de réduction du bleu de méthylène ainsi que pourrait le laisser supposer le coefficient de corrélation ($r = -0,45$) entre nombre de germes et durée de conservation jusqu'à coagulation à l'ébullition (tableau II). Dans le travail mentionné, MATTICK et al. n'ont pas indiqué le résultat des numérations bactériennes. Toutefois nous avons pu comparer nos résultats avec ceux obtenus dans les mêmes conditions par GALESLOOT (9) et étudier la répartition, en fonction de leur numération bactérienne, des échantillons du lait réduisant le bleu de méthylène en 6 heures et plus (tableau XIII). On voit que la courbe de fréquence obtenue avec nos résultats est un peu plus étendue, mais que la moyenne de position se situe à 78 800 germes par ml dans nos résultats et à 319 500 germes par ml chez GALESLOOT. DEMETER (18) indique que les laits réduisant le bleu de méthylène en 5,1/2 h et plus, renferment un nombre de germes totaux inférieur à $5,10^5$. 78 p. 100 des échantillons de GALESLOOT correspondent aux chiffres de DEMETER, de même que 78 p. 100 de nos propres résultats.

Ainsi un nombre de germes plus élevé n'est probablement pas la cause de nos durées de conservation plus courtes que celles trouvées par MATTICK et al. Dans un travail poursuivi pendant une année et portant sur 298 fermes, ROWLANDS et al. (1) constatent des différences notables, d'une ferme à l'autre, dans le comportement du lait vis-à-vis de l'épreuve du bleu de méthylène d'une part, vis-à-vis de celle de l'ébullition d'autre part. Ils notent par exemple les deux cas extrêmes : dans l'une des fermes sur l'ensemble des résultats obtenus en hiver, on observe 5 p. 100 d'échantillons coagulant à l'épreuve de l'ébullition au bout de 24 heures à 22°C alors que 95 p. 100 des échantillons réduisent le bleu de méthylène en moins de 5 1/2 h ; pendant la même période, dans une autre ferme située dans une autre région, les auteurs observent le cas inverse : 65 p. 100 des échantillons coagulent à l'épreuve de l'ébullition 24 heures à 22°C alors qu'on ne trouve aucun échantillon réduisant le bleu de méthylène en moins de 5 1/2 h. Dans le présent travail portant sur une seule ferme, il est vraisemblable que l'on se trouve dans le dernier cas ; c'est-à-dire celui d'un lait particulièrement instable à l'alcool et à l'ébullition. On trouve une confirmation de cette hypothèse dans le fait que, pour 96 échantillons de lait de cette étable (laits individuels et lait de mélange ne coagulant pas immédiatement à l'alcool), on observe une teneur moyenne en calcium ionisé de 3,10 ± 0,57 mM/litre, ce chiffre est plus élevé que celui trouvé par SMEETS (16) : 2,75 ± 0,39 mM/l pour 40 échantillons de lait normal, par TESSIER (19) : 2,50 à 3,40 mM/l et par SAKURAI et DOI (24) : 2,88 ± 0,35 mM/l pour des laits ne coagulant pas à

l'alcool. Cette teneur élevée en calcium explique probablement la durée de conservation plus courte du lait utilisé dans nos essais par comparaison avec celle trouvée par les auteurs précités.

Après cette remarque préalable, revenons à l'hypothèse formulée au début de l'exposé et qui paraît vérifiée pour les échantillons de lait examinés dans ce travail : lorsque la réduction du bleu de méthylène se produit en 6 heures ou plus la durée de conservation à 23°C jusqu'à coagulation par l'alcool ou par l'ébullition est inversement proportionnelle à la teneur du lait en calcium ionisé.

Les coefficients de corrélation assez élevés dans le cas de laits de mélange permettent d'attribuer un rôle important au taux de calcium ionisé dans ce phénomène. Ce résultat confirme les observations faites antérieurement par divers auteurs (21-22-23).

Dans la série d'essais effectués seulement avec des échantillons de lait individuel, les relations sont les mêmes mais un peu moins bonnes ; les coefficients de corrélation sont plus faibles surtout entre la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation jusqu'à coagulation par l'ébullition. Davies et White (20), dans un travail sur la relation entre la composition chimique du lait et la stabilité du complexe caséinate étudient notamment la coagulation par l'alcool et par la chaleur. Une des conclusions auxquelles parviennent ces auteurs est que le titre de l'alcool, nécessaire pour coaguler le complexe caséinate dans un mélange à parties égales de lait et d'alcool, est inversement proportionnel à la concentration en calcium ionisé, le coefficient de corrélation est de — 0,76 pour les laits individuels. Nos propres résultats sont en accord avec ces observations et cela indique un parallélisme entre la stabilité du lait vis-à-vis d'un alcool de titre plus ou moins élevé et sa stabilité pendant un nombre plus ou moins grand d'heures de conservation à 23°C.

Ces mêmes auteurs observent sur des laits provenant de lait de pleine lactation (les laits de colostrum, et de fin de lactation étant mis à part) une absence de relation entre la teneur en calcium ionisé et la stabilité à la chaleur. Toutefois les auteurs portent leurs échantillons de lait à 130°C jusqu'à coagulation, ce qui diffère notablement du mode opératoire adopté dans le présent travail. Avec des laits dont le complexe caséinate est relativement pauvre en phosphate de calcium, Davies et White constatent une faible relation entre concentration en ions calcium et durée de coagulation par la chaleur.

Dans le cas des laits individuels nous avons trouvé de nombreux échantillons (26 p. 100) coagulant spontanément à l'alcool. Nous avons vu que ces laits titraient au minimum 3,15 mM/l de calcium ionisé. Sakurai et Doi trouvent une concentration minimum de 3,20 mM/l, ce qui est en bon accord avec nos chiffres. Par contre le lait de l'étable, formé de mélange de laits normaux et de laits coagulant à l'alcool, n'a

jamais présenté le phénomène de coagulation spontanée à l'alcool. Ceci permet de penser que lorsqu'en usine on trouve de tels échantillons alors que la durée de réduction du bleu de méthylène est élevée, il s'agit presque toujours d'un lait individuel ou d'un mélange de lait de deux vaches dont l'une au moins est en fin de lactation.

Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, nous n'avons pas trouvé de cas présentant l'anomalie d'Utrecht. Nos résultats semblent indiquer que si une teneur de 4 mM/l de calcium ionisé par litre est nécessaire, elle ne suffit pas toujours à entraîner la coagulation. C'est bien aussi la conclusion à laquelle arrivent WHITE et DAVIES (20) pour lesquels « il semble qu'une teneur élevée en calcium ionisé n'est pas invariablement associée à une instabilité à la chaleur ». Ces auteurs ont trouvé des échantillons stables à la chaleur (130°C) par mi d'autres instables alors que tous titraient de 3,8 à 5 mM de calcium ionisé par litre.

Il est vraisemblable que l'influence du taux de calcium ionisé sur la durée de conservation ne se limite pas aux échantillons dont la durée de réduction du bleu de méthylène est supérieure à 6 heures et qu'elle s'exerce également sur des échantillons de moins bonne qualité bactériologique. Seulement, pour ces derniers (à partir d'un certain seuil qui reste à déterminer), l'influence du taux de calcium ionisé ne doit plus jouer le rôle principal et la durée de conservation doit être en grande partie déterminée par la qualité bactériologique que possède le lait au moment où celui-ci est soumis à l'analyse.

Les anomalies de comportement du lait au moment de l'arrivée à la laiterie (laits de bonne qualité bactériologique coagulant immédiatement à l'alcool), ont été surtout observées pendant la saison chaude. D'autre part les résultats de ce travail montrent que, dans le cas des laits de mélange dont la durée de réduction du bleu de méthylène est égale ou supérieure à 6 heures il existe en effet une bonne relation entre la température atmosphérique et la durée de conservation à 23°C (tableau X) relation que l'on peut rapprocher de celle existant entre le taux de calcium ionisé et la durée de conservation (tableau IV), de même la relation entre la température atmosphérique et la teneur en calcium ionisé est bonne (tableau IX). Toutefois le fait que les laits de fin de lactation qui coagulent plus facilement à l'alcool ou à l'ébullition sont également plus abondants en été lorsque la température atmosphérique est élevée ne permet pas dans la première série de nos essais de séparer l'influence du stade de lactation de celle de la saison ou de la température. Par contre, dans la seconde série d'essais où des résultats plus nombreux ont permis d'éliminer l'influence du stade de lactation, nous avons observé une assez bonne relation entre durée de conservation à 23°C et la température atmosphérique.

Reçu pour publication le 9 février 1960.

RÉSUMÉ

On a déterminé, sur un certain nombre d'échantillons de lait de mélange et de laits individuels, la durée de réduction du bleu de méthylène, les durées de conservation à 23°C jusqu'à coagulation par l'alcool et par l'ébullition, les teneurs en calcium total, calcium ionisé, azote total et azote de la caséine.

Pour tous les échantillons examinés le nombre de germes de même que la durée de réduction du bleu de méthylène qui était toujours au moins égale ou supérieure à 6 heures ne présentaient pas de relation avec la durée de conservation à 23°C.

Par contre, on a observé l'existence d'une relation assez étroite entre la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation à 23°C. Cette relation est meilleure pour les laits de mélange que pour les laits individuels et meilleure pour la coagulation à l'alcool que pour la coagulation à l'ébullition. Pour des teneurs en calcium ionisé élevées (au moins 3,5 mM/l) on observe assez souvent une coagulation à l'alcool dès la traite. On n'a pas trouvé de lait frais coagulant à l'ébullition (anomalie d'Utrecht) bien que certains laits atteignent 4,8 mM/l en calcium ionisé.

Il existe également une relation entre la température atmosphérique, la teneur en calcium ionisé et la durée de conservation.

Par contre on n'a pas trouvé de relation entre la durée de conservation et les teneurs en calcium total, azote total et azote de la caséine.

REMERCIEMENTS

Nous tenons particulièrement à remercier M. Mocquot, qui a bien voulu accepter la direction de ce travail, de l'aide et des conseils qu'il nous a donnés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Rowlands (A.) et Hosking (Z.). — Keeping quality and raw milk grading. III Comparison of keeping quality and dye tests in milk control. *J. Dairy Res.*, **18**, (2), 167, 1951.

(2) Porcher (C.) et Chevalier (A.). — La répartition des matières salines dans le lait. Leurs relations physiques et chimiques avec les autres principes du lait. *Le lait*, **3**, (2), 98, 1923.

(3) Porcher (C.). — La méthode synthétique dans l'étude du lait. Le lait au point de vue colloïdal. *Le lait*, **9**, (85), 449, 1929.

(4) Porcher (C.). — Action des chlorures alcalinoterreux sur l'emprésurage. *Le lait*, **10**, (93), 294, 1930.

(5) Lust (M.). — Étude du lait dont la caséine est floculée par le chauffage. *Le lait*, **32**, (315-316), 24, 1, 1952.

(6) Seekles (L.) et Smeets (T. G. M. S.). — L'instabilité du lait par suite d'une augmentation de la teneur en ions calcium. *Le lait*, **34**, (339-340), 610, 1954.

(7) Van Kreveld (A.) et Van Minnen (G.). — Calcium and Magnesium ion activity in raw milk and processed milk. Netherl. *Milk and Dairy J.*, **9**, (1), 1, 1955.
(8) Mattick (A. T. R.), Rowlands (A.), Barkworth (H.), Hosking (Z.) and Kempthorne (O.). — Keeping quality and raw-milk grading ; I-Dye tests as measures of the keeping quality of milk. *J. Dairy Res.*, **17**, (2), 159, 1950.
(9) Galesloot (T. E.). — Onderzoekingen betreffende de Methyleen blauw-proeff. *Neth. Milk and Dairy J.*, **3**, 205, 1949.
(10) Pyne (G. T.). — On the use of various sera for the determination of the soluble calcium and phosphorus in milk. *J. Dairy. Res.*, **11**, 292, 1940.
(11) Pyne (G. T.). — The microdetermination of calcium and magnesium in milk. *Analyst*, **62**, 330, 1943.
(12) Mocquot (G.), Alais (C.) et Chevalier (R.). — Étude sur les défauts de coagulation du lait par la présure. *Ann. de Tech. Agric.*, Série E, **3**, (1), 1954.
(13) Sainclivier (M.). — Étude des conditions d'emploi de la méthode de Smeets pour le dosage du calcium ionisé dans un ultrafiltrat de lait. *Ann. de l'I. N. R. A.* Série E, **8**, (2), 155, 170, 1959.
(14) Rowland (S. J.). — The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy. Res.*, **9**, 42, 1938.
(15) Sainclivier (M.). — Le paiement du lait suivant sa qualité bactériologique. — II, Variations de la qualité bactériologique des laits en fonction de la température. *Ind. Agric. Alim.*, **73**, (6), 449, 1956.
(16) Smeets (W. T. G. M.). — De bepaling van de calciumionenconcentratie in melkultrafiltraat. Thèse. Univ. Utrecht., 1952.
(17) Mattick (A. T. R.), Eddison (R. T.), Kempthorne (O.), Zena Kosking and Rowlands (A.). — Keeping quality and raw-milk grading. II — The effect of storage on the results of keeping quality and dye tests. *J. Dairy. Res.*, **18**, (1), 43, 1951.
(18) Demeter (K. J.). — Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft.
(19) Tessier (H.) et Rose (D.). — Calcium ion concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, **41**, (3), 351, 1958.
(20) White (J. C. D.) et Davies (D. T.). — The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. *J. Dairy. Res.*, **25**, (2), 236, 1958.
(21) Sommer (H. H.). et Binney (T. H.). — *J. Dairy Sci.*, **6**, 176, 1923.
(22) Mitamura (K.). — *J. Fac. Agric. Hokkaido., Univ.*, **41**, (2), 97, 1937.
(23) Eilers (H.). — Versl. Rijkslandb Proefst., s Grav., **50**, (15), G, 1009, 1945.
(24) Sakurai (S.) et Doi (T.). — Studies on the diffusible calcium, phosphorus, citric acid and ionizes calcium in milk ultra filtrat — I — On the unheated milk. *Rep. Res. Lab. Snow Brand milk Prod. Japan*, **45**, (12), 4, 1958.

TENEUR EN PLOMB DES EAUX-DE-VIE DE COGNAC

PAR

J. LAFON, P. COUILLAUD, M. CAUMEIL et M. MARCHE

Station viticole du Bureau national du Cognac.

Les auteurs, préoccupés par un projet du Ministère de l'Agriculture de Grande-Bretagne réglementant la teneur en plomb des boissons alcooliques ont recherché les doses de ce métal dans les Eaux-de-Vie de Cognac.

Les résultats obtenus font l'objet du présent mémoire. La technique analytique utilisée fait l'objet d'une « Note de Laboratoire » publiée dans le même numéro des Annales.

I. — ORIGINE DES TRAVAUX

En 1952, un projet émanant du Ministère de l'Agriculture de Grande-Bretagne, et entrant actuellement en application, tendait à limiter la teneur en plomb des boissons importées d'abord à 0,5 milligrammes, puis, par la suite à 0,2 milligrammes par litre.

Les eaux-de-vie de Cognac sont placées d'après ce texte dans le groupe des boissons dont la teneur est limitée aux très faibles valeurs précédentes, alors que des chiffres plus élevés sont tolérés pour des boissons de consommation plus courante (bière et jus de fruit par exemple).

Quelques importateurs britanniques, après avoir pris connaissance du projet ont fait doser le plomb dans divers lots de Cognac à titre de sondage pour information.

Les résultats des analyses ont mis en évidence de très grandes variations dans la teneur en plomb des divers échantillons.

Une enquête a donc été effectuée à la Station Viticole, de manière à rechercher quelles sont les quantités moyennes de plomb contenues dans les eaux-de-vie de Cognac et quelle est son origine.

II. — PROTOCOLE DES TRAVAUX ET TECHNIQUE DE DOSAGE

1° Recherché et mis au point une méthode de dosage du plomb adaptée au cas des eaux-de-vie, assez sensible, précise et suffisamment rapide pour permettre le travail en série.

2° Analysé un grand nombre d'échantillons :

— bruts avant mise en bouteilles ;

— de différentes provenances ;

— après mise en bouteilles, dans différents types de bouteilles (verre ordinaire, cristal, etc...) au bout d'un temps plus ou moins long.

A) La méthode :

La méthode utilise la réaction à la dithizone qui est maintenant devenue classique pour doser de très petites quantités de plomb.

Après évaporation de l'alcool, nous effectuons une minéralisation humide avec de l'eau oxygénée et de l'acide sulfurique. Cette minéralisation très rapide est la plus commode dans le cas du Cognac et ne nécessite pas de précautions spéciales pour limiter les apports de plomb étrangers.

La réaction colorimétrique pratiquée ensuite est très voisine de celle préconisée par Jaulmes et de celle décrite par Bonastre.

On ne recherche pas la sensibilité la plus grande de manière à réduire l'influence des apports de plomb extérieurs.

Des séparations préalables ou une double extraction ne se sont pas révélées utiles pour les eaux de vie.

Cette méthode est à la fois précise et fidèle, lorsqu'on suit scrupuleusement le mode opératoire (voir annexe).

III. — RÉSULTATS

1° Cognacs bruts :

De nombreux dosages ont été effectués sur des cognacs bruts avant mise en bouteille.

Les teneurs en plomb trouvées varient entre 0,02 mg Pb/litre et 0,3 mg Pb /litre.

Ce plomb ne provient pas du vin, mais de la dissolution d'une petite quantité de métal par l'acide acétique du Cognac au contact des soudures des alambics. Les soudures actuellement faites par brasage du métal ou à l'étain pur, étaient autrefois effectuées au plomb ou bien avec un mélange d'étain et de plomb. Les porte -alcoomètres, ainsi que les entonnoirs, décalitres et tuyaux sont en cuivre souvent étamé. Il peut entrer une certaine proportion de plomb dans l'étain utilisé.

2° Cognacs agés :

Le vieillissement, par évaporation et diminution de volume, entraîne une concentration en sels minéraux donc en plomb. Ce n'est cependant que dans des cognacs très âgés que l'on peut rencontrer des teneurs de 0,3 à 0,5 mg Pb/litre.

3° Cognacs a la mise en bouteille :

Les teneurs en plomb sont généralement un peu plus élevées à la mise en bouteille, car le Cognac passe dans des tuyauteries en cuivre, dont certaines ont été étamées ou soudées autrefois avec des mélanges étain-plomb.

Dans ce cas, ce sont les Cognacs les plus âgés, qui dissolvent le plus de plomb, car ces cognacs ont une acidité volatile plus élevée.

Certaines tireuses, à la mise en bouteilles sont entièrement étamées et peuvent être responsables d'enrichissement accidentel en début de tirage.

Actuellement, les anciens tuyaux sont systématiquement remplacés par des tuyaux en Afcodur ou en Pyrex sans soudures et les anciennes tireuses sont également remplacées par des tireuses en Afcodur ou en acier inoxydable. Les causes accidentelles d'enrichissement en plomb disparaissent donc.

Voici à titre d'exemple quelques chiffres extraits des résultats obtenus.

	Teneur en plomb en parties par millions ou mg/litre
22 juillet 1953	—
V. S. O. P. X	0,7 mg Pb/litre
18 mai 1953	
V. S. O. P. Y	0,3 mg Pb/litre
Novembre 1953	
Trois Étoiles Y.....	0,23 mg Pb/litre
9 juin 1959	
Trois Étoiles Z.....	0,18 mg Pb/litre
V. S. O. P.	0,22 mg Pb/litre
Cognac P. Vieille Réserve.....	0,25 mg Pb/litre
Cognac S. 50 ans d'âge	0,2 mg Pb/litre
Cognac X. Trois Étoiles.....	0,12 mg Pb/litre
Cognacs prélevés à la maison Y	
Mis en bouteille en 1954.....	0,1 mg Pb/litre
1949.....	0,08 mg Pb/litre
1934.....	0,07 mg Pb/litre

4° Cognacs mis en vente chez le détaillant au bout de plusieurs années de conservation en bouteilles.

Des différences assez importantes observées chez les détaillants sont dues en grande partie à la verrerie de logement ou bien au mode de fermeture des flacons.

En particulier, nous avons trouvé comme l'avaient signalé M. Gibert et Narcisse des teneurs de 1,5 milligrammes et 3 milligrammes

de plomb par litre dans des cognacs logés dans des carafes en cristal (verre au plomb).

Après avoir vidé ces carafes et les avoir remplies à nouveau de Cognac âgé exempt de plomb, la teneur du Cognac au bout de six mois est à nouveau montée à 1 mg/litre.

Comme l'avait signalé BONASTRE au sujet des vins, un enrichissement peut aussi avoir lieu dans les bouteilles couchées ou placées la tête en bas en cours de conservation, par contact du liquide avec l'intérieur des capsules en plomb recouvrant les bouchons.

Le suintement du liquide à travers les fissures capillaires du bouchon peut se produire par suite de la très grande dilatation de l'alcool, lorsque la température s'élève. Le liquide après un certain temps de contact avec la capsule revient dans la bouteille quand la température s'abaisse.

Cet enrichissement ne se produit pas dans les bouteilles conservées verticalement avec le bouchon vers le haut, ni dans les bouteilles dont les bouchons sont paraffinés.

Exemples : bouteilles d'une même marque prélevées chez différents détaillants :

	Teneur en plomb	
A	0,1	
B	0,05	
C	0,09	
D.....	0,13	
E	1,2	(bouteille en cristal)
F	0,5	(bouteille capsulée plomb, bouchon non paraffiné vers le bas).

Pour apprécier relativement la teneur en plomb des eaux-de-vie et certains produits alimentaires, voici le résultat de nos dosages sur un légume déjà étudié : l'artichaut :

Exemples

Artichaut N° 1

Poids total.....	425 g
Poids du fond.....	113 g
Teneur en plomb...	2 milligrammes p. 113 g de matière fraîche

Artichaut N° 2

Poids total.....	394 g
Poids du fond....	87 g
Teneur en plomb..	1,2 milligramme pour 87 g de matière fraîche

Ces résultats confirment ceux de M. FAUCONNIER (1).

Consommer un fond d'artichaut, du point de vue de l'absorption du plomb équivaut donc à l'ingestion de 5 à 20 litres de Cognac.

Cette simple remarque devrait inciter à une plus grande tolérance.

(1) M. FAUCONNIER. — Recherche et dosage du Plomb dans l'organisme. *Ann. Chim. An.*, **20**, 126-127, 1915.

IV. — CONCLUSIONS

Actuellement la plupart des Cognacs mis en vente dans le commerce ont une teneur en plomb inférieure à 0,2 mg/litre.

Quelques Cognacs très âgés dosent 0,3 mg/litre.

Accidentellement, on trouve des teneurs plus élevées dues :

— à l'existence de quelques anciennes tireuses contenant des soudures avec un alliage de plomb. Dans ce cas, ce sont les bouteilles remplies les premières qui sont les plus riches, ainsi que les Cognacs les plus âgés.

— à la diffusion du liquide vers la capsule à travers des bouchons non paraffinés.

— au logement dans des carafes en cristal.

Dans l'ensemble, la teneur en plomb des eaux-de-vie de Cognac ne dépasse par les limites admises par la législation anglaise ; on devrait cependant demander une plus grande tolérance pour les raisons suivantes :

— Ce sont les Cognacs les meilleurs et les plus âgés, dont les teneurs en plomb risquent exceptionnellement de dépasser les limites légales.

— Le Cognac est consommé en quantité suffisamment faible, pour que la très petite quantité de plomb qu'il peut contenir n'ait aucun inconvénient.

Avril 1960.

ANNEXE

Dosage du plomb dans le cas des eaux-de-vie

Prélever 50 à 100 ml d'eau de vie, suivant la teneur en plomb présumée, les placer dans un Erlenmeyer. Evaporer l'alcool, concentrer presque à sec, ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée (110 vol. RP) et 0,3 ml SO_4 H_2, agiter quelques instants, ajouter 4 ml H_2 O_2. Chauffer modérément jusqu'à ce que le liquide deviennne clair. Evaporer à fumées blanches. Si le liquide noircit on ajoute H2 O2 et recommence. Donner un jet de pissette pour laver les parois et évaporer à fumées blanches. Le liquide doit être clair.

Après dégagement des fumées blanches, ajouter avec précaution un peu d'eau (environ 2 ml) et environ 100 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine, porter à début d'ébullition, ajouter une goutte de phénolphtaléine et neutraliser avec NH_4 OH RP (environ 3 ml).

Ajouter 2 ml de tampon citraté réducteur dans le liquide encore chaud.

Transvaser dans un tube de 60 ml rodé, ajouter 1 ml de solution à 0,5 p. 100 CNK à pH = 9,5 qui aura servi à rincer l'Erlenmeyer.

Après *refroidissement complet,* ajouter 5 ml de tampon à la dithizone, que l'on vient de préparer immédiatement avant emploi (la couleur doit être

orange franche) et 10 ml de CCl_4. Boucher avec le bouchon rodé et agiter violemment pendant 30 secondes. Le CCl_4 doit prendre une teinte verte plus ou moins foncée mais franche.

Si la teinte est jaune vert, c'est que le milieu n'est pas au pH convenable ou a conservé des restes de produits oxydants, il faut recommencer.

Si la teinte devient rose ou grenat plus ou moins foncé, c'est que la quantité de dithizone est insuffisante pour la quantité de plomb (prise d'essai trop importante ou tampon à la dithizone défectueux).

La teinte verte obtenue, prélever au siphon d'Ambard la fraction aqueuse sans entraîner CCl_4 — remplacer par 10 ml de solution à 0,5 p.100 CNK et 0,2 p. 100 Chlorhydrate d'hydroxylamine ajustée à pH = 9,5, agiter, syphonner et recommencer jusqu'à ce que CCl_4 soit rose franc et le liquide surnageant incolore (3 ou 4 fois en général).

Agiter alors *doucement* avec 5 ml ClH 20 p. 100 contenant 4 p. 1 000 de Chlorhydrate d'hydroxylamine, CCl_4 doit devenir vert franc. Faire l'observation *immédiatement* au spectrophotomètre à 6 200 Å après avoir prélevé et filtré le tétrachlorure de Carbone (cuve colorimétrique de 1 cm d'épaisseur).

Réactifs.

Tampon à la dithizone :

a) Solution mère :

Dans une fiole jaugée rodée de 1 litre placer :

20 g de CNK
500 ml NH_4 OH
Compléter à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

b) Tampon à la Dithizone :

Au moment de l'emploi, prélever 50 ml de solution mère, ajouter 500 mg Chlorhydrate d'hydroxylamine, amener à pH = 9,5 avec ClH au 1/2 — *laisser bien refroidir avant d'ajouter la dithizone.*

Dans un mortier écraser un peu plus de 5 mg de dithizone avec 20 ml CCl_4, verser dans le tampon, agiter énergiquement et filtrer.

Ce tampon doit être préparé très peu de temps avant son utilisation.

Immédiatement avant usage, l'agiter avec quelques ml de CCl_4 que l'on laisse déposer.

Tampon citraté réducteur :

Dans une fiole jaugée de 100 ml placer

20 g Citrate NH_4
10 g Chlorhydrate hydroxylamine
5 gr Cl NH_4
Amener à pH = 9,5 avec NH 4 OH

Solution de CNK

Solution à 0,5 p. 100 de CNK additionnée d'un peu de Chlorhydrate d'hydroxylamine et amenée à pH = 9,5 avec NH_4 OH

Remarques

— La verrerie rodée en pyrex doit être lavée avec l'acide nitrique et rincée à l'eau distillée avant usage.

On ne doit utiliser que des produits RP ou bien les purifier (voir Jaulmes)

Le mode opératoire doit être respecté scrupuleusement, en particulier toutes les réactions colorimétriques doivent être effectuées à pH = 9,5 et en milieu réducteur.

Courbe d'étalonnage.

On prépare une solution mère de Pb en faisant dissoudre 100 mg de Pb dans de l'acide nitrique et en complétant à 1 litre.

En diluant 10 fois, on obtient une solution à 10 mg Pb/l.

Gamme étalon.

On prélève successivement 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ml de cette solution que l'on place dans les tubes à essais. On traite chaque tube comme la prise d'essai d'eau de vie minéralisée.

Le premier tube correspond à 0,5 γ de plomb dans la prise d'essai, soit 0,05 mg/l dans l'eau de vie pour une prise d'essai de 100 ml.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Gautier (A.). — Le Cuivre et le Plomb dans l'Alimentation et l'Industrie, Paris, 1883.

Fischer (H.). — *Zeit Angew Chem.*, **42**, 1025, 1929.

Fischer (H.), Passer (M.) et Leopoldi (G.). — *Microchem Acta*, **30**, 307, 1942.

Jaulmes (P.). — *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 239, 1942.

Charlot (G.). — Théorie et méthode nouvelles d'analyse qualitative, 196-211, Masson 1946.

Hopkin et Williams. — Lab. Réactifs organiques en analyse minérale. Éditeur Dunod, 59, 1947.

Jaulmes (P.). — Analyse des vins p. 160. Poulain-Montpellier 1951.

Deibner (L.) et Bouzigues (H.). — Procédé rapide de traitement oxydatif des vins par voie humide à l'aide du peroxyde de l'hydrogène. *Ann. Techn. Agr.* de l'I. N. R. A., **2**, 301-321, 1953.

Kretzdorn (H.) et Muller (F. X.). — Die Methodik der Bleistimmung in Wein mad der. Bleigehalt Nordbadischer Weine. *Wein und Rebe*, n° 24-25, 484, 1954.

Charlot (G.) et Bezier (D.). — Analyse quantitative minérale p. 189-190 p. 193-197 p. 652-653-654. Masson. Paris. 1955.

La Recherche du plomb dans les jus de fruits et dans les vins. — *Feuillets Oenologiques*, 764-765, mai 1955. 3, avenue St-Staens. Béziers.

Analytical Methods Commitee « the Determination of Lead in Foodstuffs ». *Analyst*, **79**, 397, 1954.

GIBERT (P.). — notes de laboratoire.
JOHNSON (E. I.) and POLPHILL. — « The Determination of Lead in Foodstuffs. *Analyst*, **80**, 364, 1955.
STRAFFORD (N.), WYALT (P. F.) and KERSHAM (F. G.). — *Analyst*, **70**, 232, 1945 et **78**, 624, 1953.
BONASTRE (J.). — Méthode Colorimétrique de microdosage du plomb dans les aliments. Thèse faculté des Sciences Bordeaux. *Ann. Techn.* de l'I. N. R. A. — Série E, **8**, 388-391, 1959.
FAUCONNIER (M.). — Recherche et dosage du plomb dans l'organisme. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux. Juillet 1914.

CONSERVATION DU GRAIN EN SILOS ÉTANCHES
INTRODUCTION ET ÉTUDE HISTORIQUE

PAR

Mme POISSON

Laboratoire de Biochimie et Physicochimie des Céréales, Paris.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction

II. — Historique.

A. — De l'antiquité à nos jours.
silos souterrains.
silos aériens.
silos « étanches » au XVIIIe et XIXe siècles.

B. — Réalisations actuelles.
silos souterrains.
silos aériens.

III. — Conclusions.

INTRODUCTION

A l'heure actuelle, parmi les problèmes les plus importants, posés dans le domaine de la conservation des denrées alimentaires, figurent : la recherche et la maîtrise des facteurs influant sur leur évolution.

L'importance de cette question avait déjà été soulignée par SCHRIBAUX (1) lorsqu'il écrivit : « Nos savants ont suivi la plante depuis la germination jusqu'à la récolte, mais ils l'ont abandonnée au seuil de nos

(1) Avant d'exposer les résultats des travaux effectués au Laboratoire de Biochimie et Physicochimie des Céréales, en liaison avec le C. N. E. E. M. A. et l'E. F. M., sur l'évolution biochimique et technologique des grains conservés en silos étanches, il nous a paru intéressant de faire successivement dans ces Annales :
— une brève étude historique de la question ;
— une description des modes de construction des silos étanches ;
— une étude critique des recherches biochimiques réalisées antérieurement sur ce sujet.

celliers et de nos greniers. » L'obtention de produits agricoles de bonne qualité ne suffit pas, encore faut-il savoir les conserver correctement si l'on veut satisfaire aux exigences du transformateur, du consommateur et de l'hygiéniste, d'où l'intérêt que présente l'étude de l'opération stockage.

Les altérations susceptibles d'affecter le grain au cours de sa conservation sont de trois ordres :

— biochimique : résultant des réactions enzymatiques vitales de la graine, et de réactions chimiques de ses constituants entre eux ou avec l'oxygène de l'air. Ces réactions peuvent se produire même à de faibles teneurs en eau, au cours de longues durées de stockage ;

— microbiologique : dû à la croissance et à la multiplication des microorganismes, principalement des moisissures;

— zoologique : consécutif à l'activité des insectes et des rongeurs.

Pour lutter contre ces phénomènes, l'ensilage plus ou moins hermétique a été utilisé et préconisé à maintes reprises depuis la plus haute antiquité.

Vayssière qui a beaucoup étudié l'aspect zoologique de ce mode de conservation (2) le définit comme l'emmagasinage d'un produit agricole dans un récipient ou dans un local à l'abri de tous les échanges gazeux ou liquides avec le milieu extérieur.

Ce procédé permet de protéger le grain contre toute pénétration de rongeurs ou d'insectes venant de l'extérieur ; et de lutter contre l'échauffement de la masse du grain, dû au métabolisme de la graine, de la microflore et des insectes déjà installés. L'augmentation de la teneur en gaz carbonique et la diminution rapide du taux d'oxygène, dans l'atmosphère du silo étanche, résultant de l'activité des organismes vivants aérobies, entraînent rapidement leur mort.

II. — Historique

Le problème du stockage de quantités importantes a dû se poser dès que l'homme, devenu sédentaire, s'est efforcé, par des solutions empiriques, de préserver les récoltes des déprédations auxquelles elles sont inévitablement soumises, si elles sont stockées sans précautions.

Le mot « silo », dérivé du grec « siros » et du latin « sirus », aurait pour origine étymologique, d'après certains auteurs, le nom d'un des plus grands marchés mondiaux de grains qui se tenait autrefois à « Selum », près de Jérusalem. Là, se trouvent encore les vestiges de grandes fosses maçonnées qui constituaient des silos souterrains. Chez les Maures, les « Sylos », étaient des fosses souterraines.

Les procédés de conservation primitifs et la forme des silos ont été influencés par les conditions climatiques, la nature des sols, et les modes de construction locaux.

Dans toutes les régions où l'on peut récolter des grains secs, ayant des teneurs en eau de l'ordre de 6 à 10 p. 100 (dans une zone située sensiblement entre le 48e et le 30e parallèle, Orient et pays méditerranéens), les fosses étaient creusées dans le roc ou dans la terre sèche, et affectaient généralement la forme de bouteilles, ce qui facilitait l'obturation de l'ouverture relativement étroite.

Les Serbes et les Valaques, dans leurs pays de terre meuble et humide, construisaient les « bouteilles à céréales » au-dessus du sol.

A. — Les silos étanches de l'antiquité à nos jours.

1° Silos souterrains.

L'existence de silos, plus ou moins étanches, est attestée dès l'antiquité par VARRON et QUINTE-CURCE, postérieurement par BEGUILLET (3), l'abbé PONCELET (4), et DOYÈRE (5). De nos jours, OXLEY (6), a enquêté sur l'utilisation de silos primitifs encore en service.

Dans les pays méditerranéens, les fosses à grains les plus anciennes, étaient creusées à flanc de colline dans des terrains secs. Quelques jours avant l'ensilage du blé, on brûlait de la paille dans le silo afin de dessécher et de durcir le fond des parois, puis on le tapissait de paille très sèche. Après remplissage, suivant les régions et les époques, l'ouverture était fermée hermétiquement avec de la terre ou de la paille fortement tassées, puis recouverte soit d'un petit toit de terre gazonnée ou de chaux humide qui formait un mortier, soit d'un couvercle de pierre taillée, cimentée dans son logement.

Dans l'ancienne Egypte, les silos à grains étaient entourés de murs épais en granit, joints et cimentés. La « citerne » où JOSEPH fut jeté par ses frères était une fosse à grains.

La magnificence des Romains se manifesta dans toutes les provinces de leur empire par la construction de greniers publics. « Ils mettaient en œuvre, pour leurs greniers souterrains toutes les ressources de leur habileté merveilleuse dans l'art des constructions en maçonnerie, par exemple, en AFRIQUE du Nord, où l'on trouve de nombreux silos souterrains, plusieurs de ces greniers, près d'ORAN et à ARZEU, ont été mis à l'abri de l'eau extérieure par des précautions multipliées (5) ».

Les blés qu'ensilaient les Romains et les Maures étaient des blés très secs, et leurs silos étaient à l'abri de l'air atmosphérique et de l'humidité du sol par la perfection de leur construction ou par la nature de leurs parois. VARRON assure que le blé en épis se conservait pendant cinquante ans

dans les fosses creusées sous terre et fermées avec soin afin que l'air ne pût y pénétrer (3). Au XVIIIe siècle on a retrouvé en SICILE du grain en parfait état, dans de grandes fosses souterraines remplies depuis des temps immémoriaux.

A HERCULANUM, ensevelie en 79, on dit avoir retrouvé du blé parfaitement conservé dans une installation de ce genre. PLINE cite les fosses de la THRACE et signale qu'en AFRIQUE et en ESPAGNE les grains étaient « serrés » avec les épis, et que les semences se conservaient mieux lorsque l'air ne pénétrait pas (3).

En FRANCE, où les terrains propices à ce genre de construction sont rares, les silos romains d'Amboise sont des caves creusées dans la roche dure de la colline qui borde la Loire (ce sont peut-être là les fameux greniers de CÉSAR.)

Près de CALAIS, les auteurs du XVIIIe siècle signalent les « poires d'ARDRES » constituées par neuf magasins construits dans un grand souterrain, où la conservation était excellente pendant plusieurs années (3).

DOYÈRE (5), au siècle dernier, étudie les procédés de conservation dans les pays où ils s'avèrent efficaces. Il donne d'amples détails sur la conservation en silos étanches telle qu'elle était pratiquée en ESPAGNE du temps des Maures et au siècle dernier.

« Il existe en ESPAGNE d'anciens silos creusés par les Maures, qui prouvent que ce peuple ne reculait pas devant les plus grandes difficultés pour exclure l'humidité extérieure ; à ALCALA DE GUADAYRA, près de SÉVILLE, ce sont des cavités taillées dans un grès compact et très dur sans assises et sans fissures. »

Sur place, DOYÈRE constate que ce genre d'ensilage est encore pratiqué en ESTRAMADURE où les blés ont une teneur en eau de 6 à 7 p. 100 au moment de la récolte.

La ville d'ALMENDRALEJO devait posséder alors quelque 3 000 silos contenant 220 000 hectolitres de blé, fruits de 5 années de réserve. « Ces silos étaient creusés dans un sol sain, relativement compact, fortement siliceux, peu perméable et dans un emplacement possédant un bon écoulement naturel des eaux. Chaque année la couche supérieure du grain était visitée, extraite si nécessaire, aérée, séchée au soleil, puis ensilée à nouveau. Outre les conditions d'herméticité où se trouve la plus grande partie du grain, DOYÈRE voit dans ce procédé la possibilité de soustraire le blé à l'influence de la température extérieure (qui en quelques jours, l'été, peut présenter des écarts de l'ordre de 20°C).

Dans la zone méditerranéenne, citons encore, sur la côte nord de CHYPRE, une cinquantaine de puits en forme de bouteille, creusés à flanc de colline et groupés à la sortie des villages, le goulot est fermé par de la boue et une pierre plate. Ils dateraient, peut-être, de l'époque byzantine, ils sont encore utilisés de nos jours (fig. 1). Ils ont un diamètre d'en-

viron 1,2 m dans la partie la plus large, de 30 cm au niveau du goulot, et une profondeur de 1,8 m (6).

En AFRIQUE, OXLEY et son équipe ont étudié les modes d'ensilage primitifs encore pratiqués par les indigènes.

Aux SOMALIES (fig. 2), les puits sont creusés de préférence (quand le

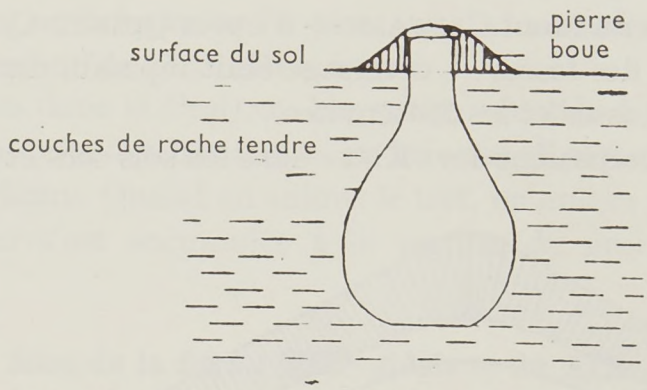


FIG. 1. — Coupe d'un puits primitif, circulaire, à Chypre. Reproduction d'après D. W. Hall, G. A. Haswell, T. A. Oxley (6) axec l'aimable autorisation de « Her Majesty's stationery Office ».

choix est possible) dans de la roche dure et calcaire. Il existe des puits de toutes tailles, depuis le petit puits familial (1,8 m de profondeur sur 1,5 m à 1,8 m de largeur) pouvant contenir 2 tonnes de maïs, jusqu'au grand puits de 20 tonnes (de 3,6 m. de profondeur sur 3,6 m. de largeur).

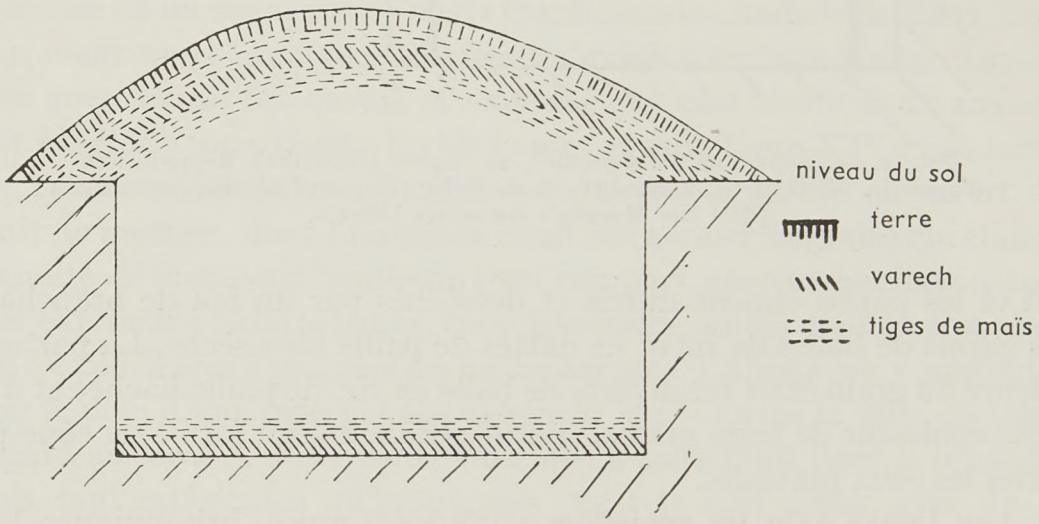


FIG. 2. — Coupe d'un puits primitif aux Somalies (carré). Reproduction d'après (D. W. Hall, G. A. Haswell, T. A. Oxley) (6) avec l'aimable autorisation de « Her Majesty's stationery Office ».

Ces fosses s'ouvrent à la surface par des goulots étroits (de 60 cm de diamètre) obturés avec de l'humus et une grosse pierre. Dans certaines régions, ces fosses sont noyées, puis séchées par le feu, afin que les parois restent sèches et dures. La conservation du grain dans de telles installations paraît satisfaisante. D'autres grands puits (20 tonnes) carrés, ont une ouverture aussi large que le fond, la partie supérieure du grain est

recouverte d'un dôme constitué de couches successives de paille de maïs, de varech et de terre.

Dans le NIGERIA nord, existent des excavations circulaires de 1,8 à 3 m de diamètre et de 1,2 m à 3 m. de profondeur, recouvertes de façon analogue (fig. 3). Le maïs s'y conserverait bien pendant 3 ans et même 7 ans selon les indigènes. Le millet donnerait encore de meilleurs résultats.

Les Barbares du Mont CAUCASE — d'après QUINTE-CURCE, cachaient leurs grains dans des fosses — cet usage était répandu dans toute l'ASIE, jusque chez les Russes et les Moscovites.

Les Chinois creusaient des « Kiar » dans les sols secs et consistants. Le

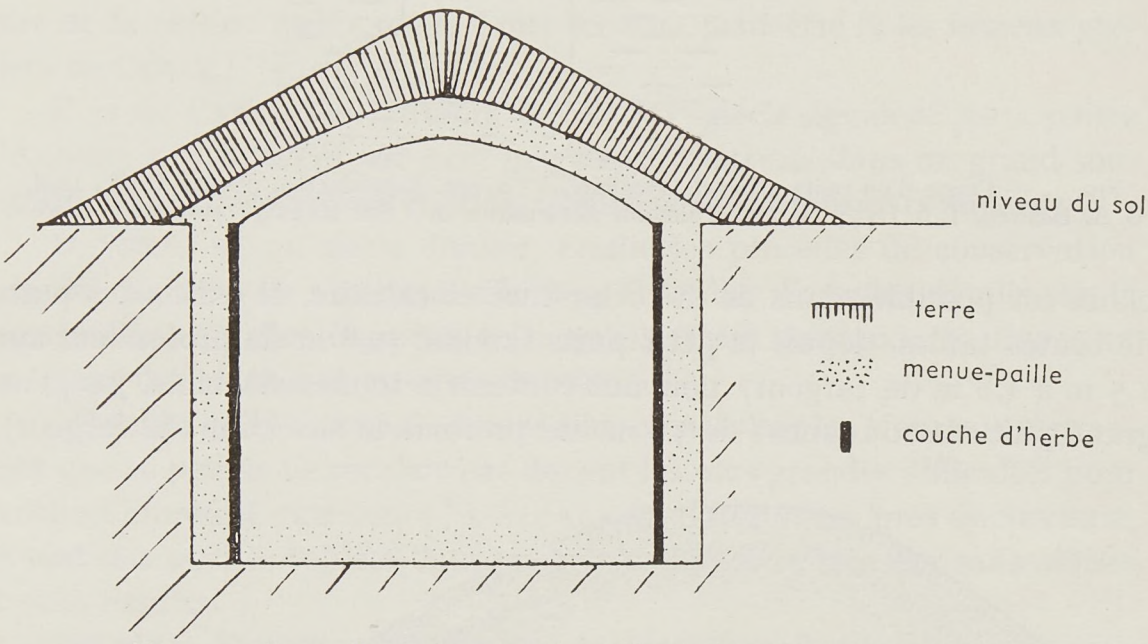


FIG. 3. — Coupe d'un puits primitif, au Nigeria (circulaire). Reproduction d'après D. W. Hall, G. A. Haswell, T. A. Oxley (6) avec l'aimable autorisation de « Her Majesty's stationery Office ».

fond et les parois étaient durcis et desséchés par un feu de branchages, puis garnis de balles de riz et de nattes de paille bien sèche. La partie supérieure du grain était recouverte de balle de riz, de paille hachée et d'une bonne épaisseur de terre grasse, battue, travaillée en forme de cône pour écarter les eaux pluviales.

Aux INDES dans les anciennes « provinces unies » britanniques, le blé est versé dans des puits circulaires, garnis de paille à l'intérieur et dont l'orifice supérieur est obturé ; malheureusement le grain prend une odeur de moisi dans ces fosses, sans doute trop humides.

2° Silos aériens.

Dans tous les pays où le sol humide ne permet pas l'obtention de fosses sèches, les silos s'élèvent à la surface du sol.

En SERBIE et en VALACHIE, les terres meubles et humides ne permet-

tant pas l'installation de fosses étanches, les paysans construisaient « leurs bouteilles à céréales » au-dessus du sol.

« Les silos étaient circulaires, les parois de briques crues et desséchées par un feu de bois, le fond et les côtés revêtus de nattes et la partie supérieure recouverte d'un remblai conique en argile battue (7) ».

Les Chinois, en terrains humides ou marécageux, édifiaient des tours rondes (Kouen) en briques ou en pisé, sans ouvertures latérales et garnies extérieurement de contreforts épais.

Aux INDES dans le PENJAB, les grains récoltés à 9-10 p. 100 d'eau, sont conservés dans des bâtiments en briques (KOTHA), murés ensuite à la partie supérieure. Quand on enlève le toit, on enlève aussi la couche de charançons qui s'est accumulée à la surface du grain (8).

3°. Silos de la fin du XIIIe siècle et du XIXe siècle.

En Europe, les conquérants barbares renversèrent l'édifice établi par les Romains. Ils ne constituèrent pas de réserve de grains. La tradition se perdit. Le moyen âge qui connut dans nos pays des disettes effroyables ne semble pas avoir su conserver les grains. Le XVIIIe siècle, plus prévoyant, vit se reconstituer des réserves, dans les greniers publics, mais en atmosphère renouvelée. Cependant, l'abbé PONCELET (1779), rapporte l'anecdote « d'un magasin de « bled » établi dans la citadelle de METZ, un peu auparavant que l'Empereur Charles V s'avisât d'en faire le siège. Le magasin en question ne fut ouvert et examiné que cent trente deux ans après avoir été établi ; on y trouva le « bled » pur, et sain. Louis XIV en fit faire du pain, en mangea et le trouva excellent ». Ce blé avait été recouvert d'un enduit de mortier, dont l'humidité avait fait germer les grains qui étaient à proximité, le tout avait formé « un tissu compact, absolument impénétrable à l'air extérieur « Eclairé par ce trait historique, guidé d'ailleurs par beaucoup d'expériences à peu près de même nature », l'Abbé s'est « appliqué à tracer le plan d'une espèce d'encaissement (de la forme la plus commode, eu égard au local et à la quantité de bled à conserver) dont le fond et les parois, tant extérieures qu'intérieures (fig 4-5) sont crépis avec du bon ciment. Le blé, battu trois ou quatre mois après la moisson afin qu'il ait eu le temps de bien « jeter son feu », devait être « bien sec, exempt d'ordures et de poussière, purgé de toute espèce d'insectes. », l'encaissement était ensuite clos avec des planches proprement rabotées, toutes les jointures collées avec des bandes de toile, enduite de bonne colle de farine (dans laquelle on avait fait bouillir quelques gousses d'ail), les planches recouvertes d'une couche de sable sec d'un pied à 15 pouces d'épaisseur. Le « bled », par ce moyen, devait se conserver sans altération, pendant plusieurs siècles !

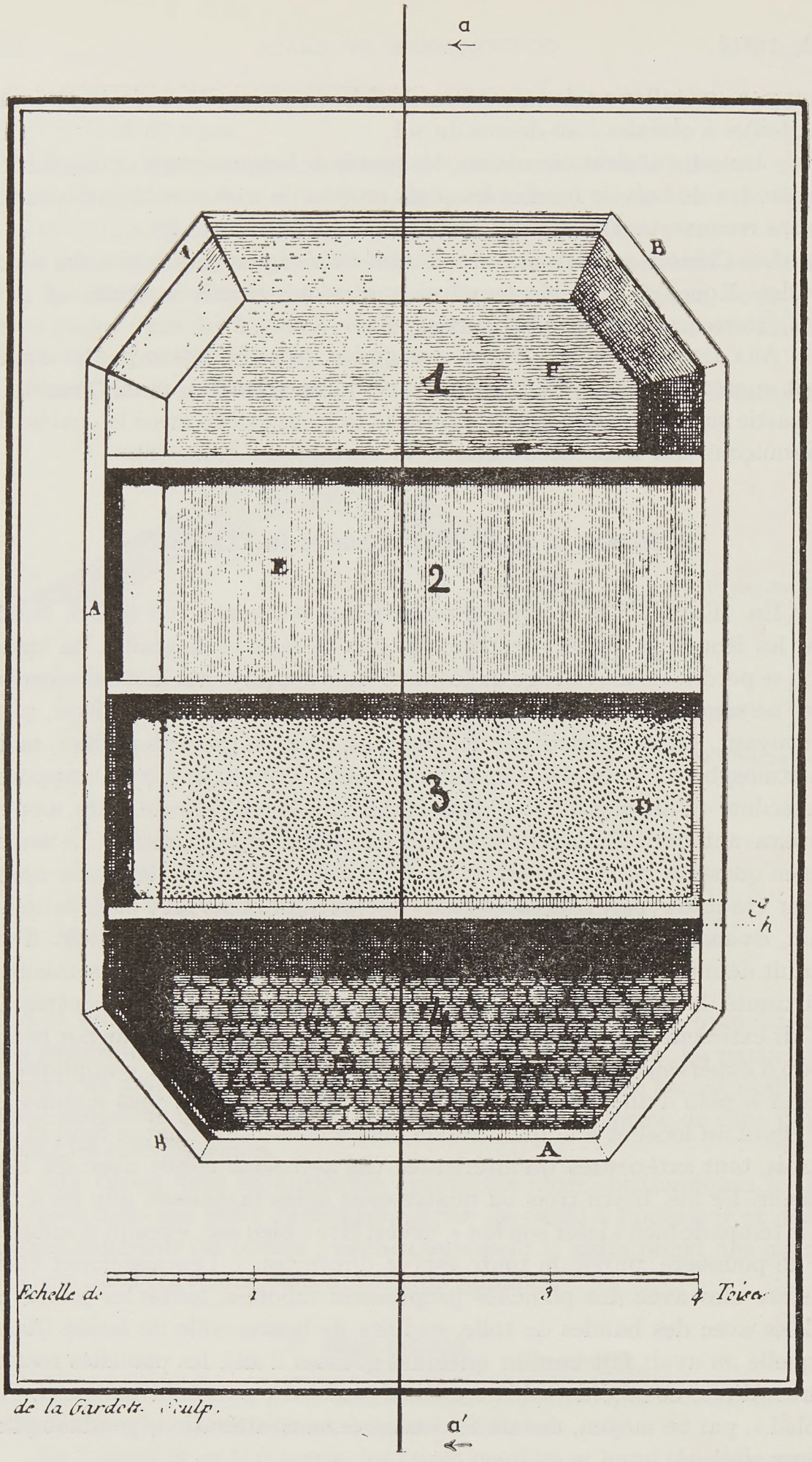


FIG. 4. — Silo étanche — par M. l'Abbé Poncelet, 1779.
Vue fractionnée selon les plans 1 — 2 — 3 — 4.

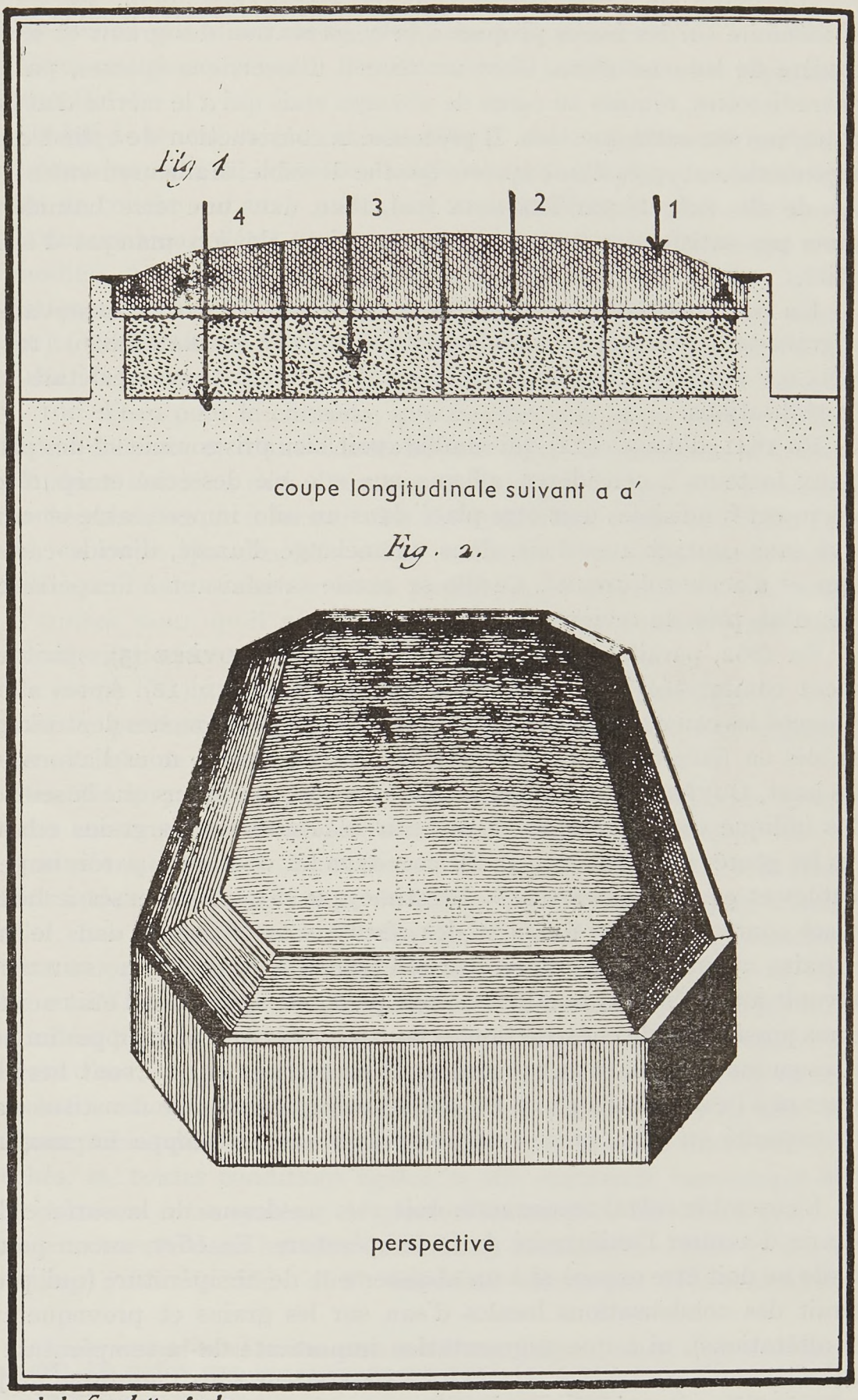


FIG. 5. — Silo étanche — par M. l'Abbé Poncelet

Au début du XIXe siècle, M. de LASTEYRIE, 1819. (9) publie un mémoire sur les fosses propres à la conservation des grains et sur la manière de les construire. C'est un recueil d'assertions éparses, parfois contradictoires, réunies au cours de voyages mais qui a le mérite d'attirer l'attention sur cette question. Il préconise la construction de cylindres en maçonnerie, entourés d'une épaisse couche de sable. Malheureusement, ce type de silo, exécuté par TERNAUX (10), 1820, dans une terre humide ne donne pas satisfaction ; sans doute en raison de son manque d'étanchéité.

Un peu plus tard, des expériences satisfaisantes sur la conservation du grain sont réalisées par de RIGNY (1821) (10), DEJEAN (1826) (10) et DEMARCY en 1838 (10) ; malheureusement nous manquons de détails sur ces réalisations.

En 1841, d'ARCET (11) qui semble avoir bien pris conscience des principaux facteurs à considérer, affirme que « le blé desséché et épuré de tous insectes nuisibles doit être placé dans un silo imperméable et conservé sans contact avec l'air, dans un mélange d'azote, d'acide carbonique et d'acide sulfureux «. Ce silo se révèle satisfaisant à l'expérience, mais d'un prix de revient trop élevé.

En 1862, paraît la très importante étude de DOYÈRE (5), spirituellement commentée il y a peu de temps par JOSSOUD (12). Après avoir recherché les causes d'échec et de réussite des différents modes de stockage des blés en ESPAGNE et en AFRIQUE DU NORD, comme nous l'avons vu plus haut, DOYÈRE résume ainsi « l'ensemble des conditions que la science nous indique comme propres à garantir indéfiniment les grains contre tous les genres d'altération : du blé sec, dans un vase sec à parois imperméables et exactement fermé ». Il estime que des silos creusés à même un sol compact et sec, donnant des résultats satisfaisants dans le cas de grains ayant des teneurs en eau inférieures à 10 p. 100 ne sauraient convenir aux blés plus humides de nos pays, et « que dans l'état actuel de nos possibilités de construction, il faut renoncer aux enveloppes immédiates en maçonnerie et aux revêtements en mortier qui ne sont hermétiques ni à l'eau ni à l'air ». « Le silo hermétique doit être constitué par une capacité en tôle mince, enfermée dans une enveloppe en maçonnerie. »

L'ensemble métal-maçonnerie doit être au-dessus de la surface du sol afin d'assurer l'uniformité de la température. En effet, aucun point du silo ne doit être exposé ni à un abaissement de température (qui produirait des condensations locales d'eau sur les grains et provoquerait des altérations), ni à une augmentation importante de la température : « des blés humides comme les nôtres s'altèreraient sous l'influence de la température seule » même en récipients étanches.

DOYÈRE fait exécuter plusieurs de ces silos en terrain sec et en ter-

rain humide. Il poursuit des essais, pendant sept années, sur des blés ayant des teneurs en eau allant de 13, 36 p. 100 à 19 p. 100. (1)

Voici quelques exemples détaillés choisis parmi les plus typiques : (tableau I).

Un blé de teneur en eau égale à 16,85 p. 100, ayant chauffé sur plancher, donc inapte à se conserver longtemps en grenier, possédant une « odeur de couche » et un « goût amer » est ensilé pendant 6 ans, laps de temps durant lequel l'état où il se trouvait au moment de l'ensilage n'est pas modifié. A un mètre de profondeur, il reste frais et coulant, la fermentation s'est trouvée arrêtée, la composition de l'atmosphère modifiée et la température de la partie supérieure n'a pas dépassé 18°C (2), pour lui, cette expérience prouve « que les blés contenant au plus 16 p. 100 d'eau pour le chimiste, que les blés secs et de bonne qualité, coulants à la main et d'une odeur franche pour le praticien, se conserveront dans nos silos sans altération, sans dépréciation, et y pourront, par conséquent, servir à former des réserves d'une durée indéfinie. Elle prouve en outre que des blés d'une condition beaucoup moins bonne peuvent encore s'y conserver assez parfaitement pendant un bon nombre d'années pour qu'il n'y ait ni déchet, ni perte à mettre au compte de la conservation ».

Ce même blé, ramené à des teneurs en eau de 14,2 et 13,36 p. 100, se conserve pendant 6 ans sans modification et sans que l'atmosphère du silo ait subi de changement.

Des blés à 17,3 et 17,5 p. 100 d'eau sont ensilés par mauvais temps, dans des constructions faites en terrain humide, sous pierrailles, noyées par la marée montante à Cherbourg. A Brest, un seau de bois, placé sur le dessus du blé a reçu 1,5 kg de sulfure de carbone et 0,5 kg d'huile à brûler. Les blés prennent une odeur spéciale qui disparaît à l'aération.

Doyère en conclut que « des blés même très humides peuvent être gardés en silo sans aucun danger, seulement la durée de leur séjour y doit être limitée, l'odeur et le changement qu'elle manifeste s'y développeront d'ailleurs d'autant moins que l'ensilage aura eu lieu par une température plus basse ». « Les blés qui courent le risque de s'altérer dans les silos ne sont susceptibles de se conserver par aucun autre procédé sans avoir été desséchés, et, toutes conditions égales, le silo souterrain hermétique ne le cède à aucun autre système de grenier, même pour les silos à grain ». Le blé se conserve dans les silos souterrains hermétiques, sans qu'il soit nécessaire d'y faire le vide... ni d'y introduire aucun gaz, ni aucune autre

(1) La teneur en eau du blé est déterminée par un chauffage de 24 heures, à une température de 125-130°C. Les chiffres sont donc voisins de ceux donnés par la méthode de référence actuellement en vigueur.

(2) Doyère justifie ce choix surprenant au premier abord en affirmant que le seul avantage présenté par une expérimentation avec du grain de qualité supérieure est de pouvoir montrer des résultats plus spectaculaires.

substance étrangère. « Les silos doivent être souterrains pour remplir la condition essentielle d'une température basse et aussi peu variable que possible ».

Il faut noter qu'à l'époque où travaillait DOYÈRE, on était beaucoup moins exigeant sur la qualité des grains que maintenant. Les résultats qui parurent satisfaisants ne seraient peut-être pas considérés comme tels actuellement. Un blé peut avoir bel aspect et être fortement altéré du point de vue technologique, et nutritionnel, comme nous le verrons dans les chapitres ultérieurs. De même sur la qualité du pain (goût, texture, couleur...), les exigences d'alors étaient beaucoup moins rigoureuses.

Au cours de ses expériences, outre les critères de bonne conservation du grain, en vigueur à l'époque (poids de la marchandise conservée : poids net du lot conservé, poids de l'hectolitre de blé, aspect du grain), DOYÈRE a eu le mérite de prendre en considération deux facteurs précis : la teneur en eau des grains et la température d'ensilage et de conservation.

En 1861, HAUSSMANN père (13) fait exécuter des silos métalliques où le grain était conservé en atmosphère d'azote ou de CO_2 parfaitement sèche, LOUVEL (13) conçoit des silos en acier où le vide est fait aussitôt après introduction du grain.

Un peu plus tard, en 1879, MUNTZ, (13) pour le compte de la compagnie des omnibus de PARIS, étudie la conservation de l'avoine en silos étanches. Il s'attache à déterminer les variations de composition de l'atmosphère des silos. Il compare la respiration de l'avoine en atmosphère confinée et en atmosphère renouvelée, à différentes températures et à différentes teneurs en eau. Il constate que la production de CO_2 croît en raison directe de la tension de l'O_2 et en raison inverse de la tension de CO_2 déjà formé ; elle croît en outre avec la température et l'humidité.

Les conclusions de MÜNTZ rejoignent celles de DOYÈRE, à savoir que le grain sec et froid au moment de l'ensilage doit être conservé dans des conditions rigoureuses d'herméticité et soustrait aux variations de la température extérieure. Malheureusement, parmi les silos souterrains (fig. 6) ou semi-souterrains (fig 7). mis à la disposition de MÜNTZ, plusieurs ne sont pas complètement étanches, ni à l'air, ni à l'eau, et son expérience aboutit à un échec (tableau I). Ce procédé ne connaît ni extension ni amélioration pendant près de 60 ans.

Il a régné beaucoup d'empirisme et les enseignements qu'on aurait pu tirer des remarquables expériences de DOYÈRE et de MÜNTZ n'ont pas toujours été compris. De plus, à tous ces essais, il a manqué des méthodes d'analyses suffisantes des phénomènes se produisant au cours de l'ensilage hermétique.

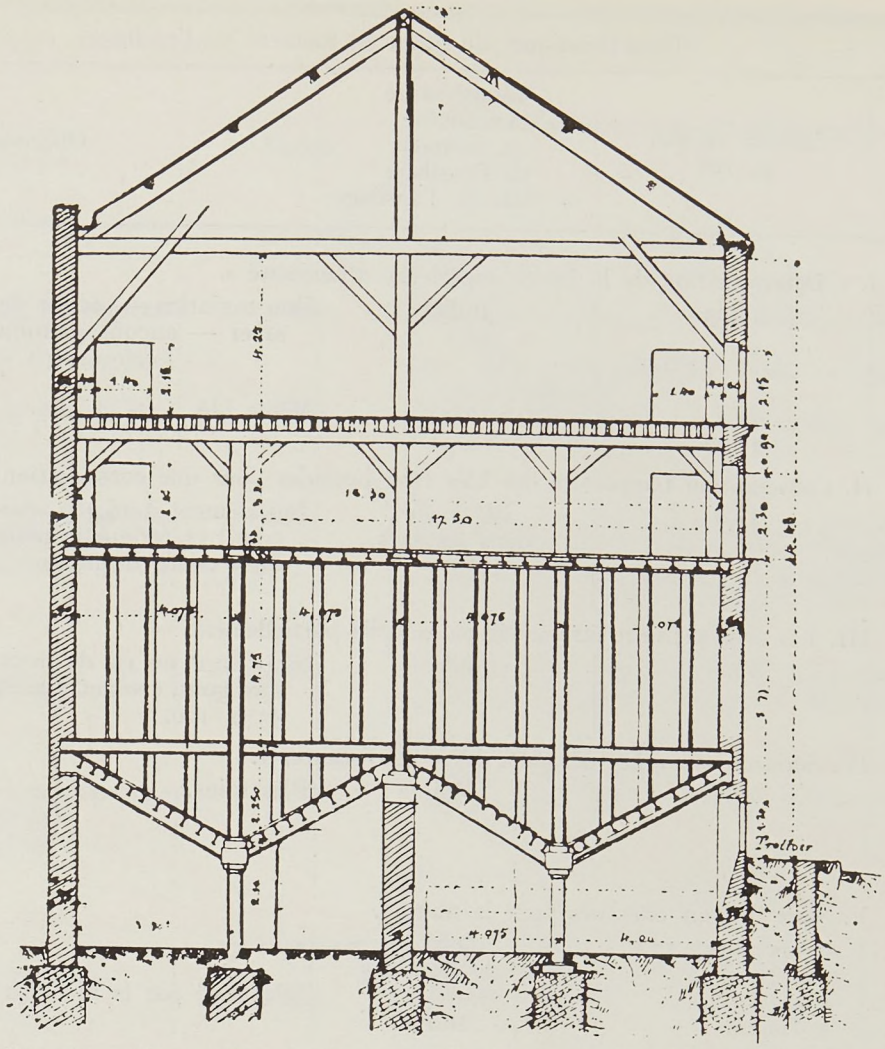


FIG. 6. — Coupe d'un grenier avec silos. Reproduction d'aprés MÜNTZ (14)

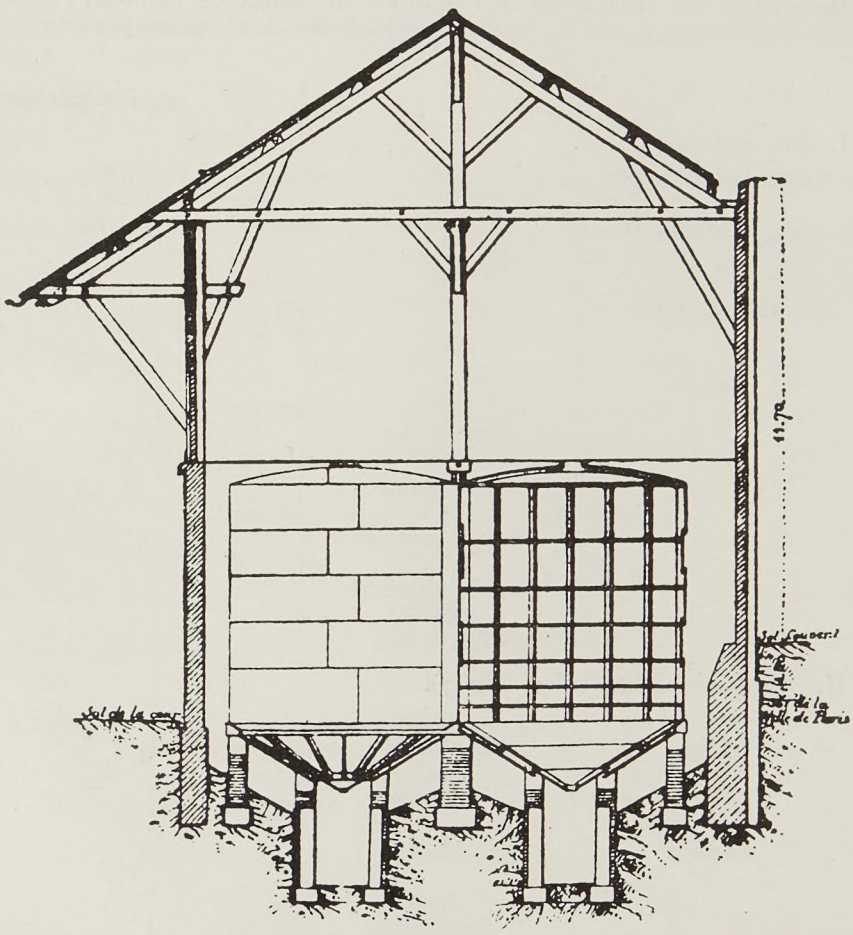


FIG. 7. — Coupe des greniers à silos du dépôt de la rue Monge. Reproduction d'après MÜNTZ (14)

Caractéristiques du grain au moment de l'ensilage				Conditions de stockage		Caractéristiques du grain après ensilage
Nature du grain	Teneur en eau p. 100	Température extérieure au moment de l'ensilage ou date de l'ensilage	Observations	Observations	Durée	
	I. « Détermination de la limite supérieure d'humidité ».					Essais Doyère
Blé.....	16,85	Juillet	Bon maintien — odeur de couche prononcée, goût amer — aucune germination.	— à la partie supérieure la température a atteint 18°C ; — bougie s'éteint dans l'atmosphère du silo ;	6 ans	En surface : forte odeur de moisi — âcre — dur à la main, A 1 mètre de profondeur : frais — coulant à la main alucite disparu.
Blé.....	14,2	—	Même blé.	— bougie ne s'éteint pas dans le silo.	6 ans	Aucun changement, dans aucune partie — alucite disparu.
Blé.....	13,36	—	—	—	—	—
	II. Conservation temporaire des blés trop humides pour une conservation indéfinie.					
Blé.....	18,6	Blé à 26°C dans les sacs	Initialement à 16,2 p. 100 humidifié il est devenu gourd et rude à la main, tendre sous la dent — forte odeur de moisi.	Dans le col odeur de moisi disparaît, puis odeur vineuse, enfin odeur de lait caillé pendant l'hiver, à 50 cm aucune odeur.	1 an	En surface : odeur prononcée — âcre au goût. Dans la masse : ni âcreté, ni amertume, très faible odeur dans l'intérieur du silo qui disparaît au pelletage — entièrement roché — ne germe plus — gluten intact.
	III. Les silos peuvent être vidés ou remplis partiellement.					
Blé.....	16,4	Juin	Silo rempli au 1/4 de sa capacité — blé sans odeur, sans goût, coulant à la main ; pouvoir germinatif : 33 p. 100.	Air assez peu altéré.	3 ans	Conservation parfaite, blé frais, sans humidité (condensation) sans odeur — pouvoir germinatif 31 p. 100.
	IV. Série d'essais effectués pour les « subsistances ».					
Blé.....	15,3	Mai	Blés sains.	Air des silos non altéré — température des silos { à l'intérieur 11°C / à l'extérieur 28°C	1 an	Blés en aussi bon état qu'au moment de l'ensilage.
Blé.....	15					Excellente farine, excellent pain.
	V. Série d'essais effectués pour la marine.					
Blé.....	à Cherbourg 17,5	Mars temps mauvais			17 à 18 mois	{ Odeur spéciale qui disparaît à l'air.
Blé.....	à Brest 17,3	Janvier	Silo noyé par la mer aux marées d'équinoxe.		2 ans	{ Bonne mouture.
Blé.....	à Toulon	Mai				
	VI. Applications diverses.					
Blé.....	Destruction des charançons (par addition de sulfure de carbone) : réussite totale (expérience pour					suivie en Algérie).
Blé.....	Blés humides (19 p. 100 d'eau) sont desséchés dans le silo même par un courant d'air chaud (70°C) puis					par un courant d'air froid : bonne conservation — blé amélioré — excellent résultat à la mouture et à la panification.
						Essais Müntz
	en silos métalliques, hermétiquement clos,			doublés d'une enveloppe en maçonnerie.		
	I. Silos aériens (fig. 6).					
Avoine	12,5 et 17,8 p. 100	21°C		Température interne s'élève à 48°C.	3 mois	Couche supérieure altérée près des ouvertures — le reste de la masse en bon état.
Avoine	19,27 et 15 p. 100	2°C		23°C à 3 m de profondeur et 14°C en surface.	3 mois	Couche de grains agglomérés à la partie supérieure et dans les coins, reste de la masse en bon état — encore 19,1 p. 100 d'O_2 à 2 m, donc joints non étanches.
Avoine	18,3 p. 100				5 mois	Très altérée en surface (37°C et jusqu'à 55 p. 100 d'eau par place). Bon état au centre (20°C et 15,4 p. 100 d'eau) marche ascendante de l'humidité.
Maïs		8°C temps sec			110 jours	Pas d'altération apparente, mais début d'échauffement — odeur alcoolique.
Maïs		26°C beau temps			108 jours	Germé, chaud et altéré.
Maïs		15°C temps humide			60 jours	Altération peu notable.
Maïs		26°C temps pluvieux			83 jours	Germé, altéré, chaud.
Féverole		25°C beau temps			121 jours	Bon état, odeur de renfermé.
	II. Silo partiellement enfoui (fig. 7).					
Avoine de Russie ...	sèche	Décembre			476 jours	Bon état.
		Juin			422 jours	—
		Novembre			378 jours	—
Avoine de Suède ...	humide	Mars				Très altérée.
Maïs du Danube .		Août			135 jours	Bon état.
		Septembre			402 jours	—

B. — Réalisations actuelles

1° Silos souterrains.

En 1929, de nouveaux échecs sont essuyés aux U. S. A., à cause du manque d'étanchéité des silos (15).

En 1940, la guerre arrête toute exportation et l'ARGENTINE se trouve dans l'obligation de stocker d'importantes quantités de blé pour plusieurs années.

LOPEZ (16), après avoir étudié la conservation du grain dans des excavations souterraines déjà existantes, recommande la construction de cavités enfouies dans le sol et étanches à l'air et à l'eau ; nous étudierons dans les chapitres suivants leur mode de construction. La réussite est plus complète qu'on ne l'avait escomptée. Du blé et du maïs, stockés pendant 7 ans se conservent parfaitement, malgré le climat chaud et quelque peu humide. Les essais de panification, effectués en ANGLETERRE, à partir du blé ainsi conservé, furent satisfaisants et l'invasion des insectes stoppée. Le blé ensilé lors du premier essai avait une teneur en eau de 11-13 p. 100. Le pourcentage de gaz carbonique dans l'espace intergranulaire monta à 15 p. 100 en deux semaines, puis lentement s'éleva jusqu'à 20 p. 100, la diminution de la teneur en oxygène correspondant à l'augmentation en gaz carbonique. Lors de son premier rapport, LOPEZ indiqua que le pouvoir germinatif du grain avait diminué de 5 p. 100 ; par la suite, d'après d'autres essais la diminution du pouvoir germinatif fut estimée à 15 p. 100 au bout de deux ans de conservation, et à 50 p. 100 après 4 ou 5 ans. Il faut noter qu'à une profondeur d'environ 1,6 m les variations de températures dues aux fluctuations saisonnières sont très faibles.

Dans ce genre de fosses, 0,5 p. 100 du blé est perdu, du fait de l'adhésion des grains aux parois, qui ne sont pas complètement imperméables à l'eau. Mais cependant, ces puits, à condition qu'ils soient au moins à moitié remplis, permettent une bonne conservation des grains dont la teneur en eau ne doit pas dépasser 14 p. 100. En raison du succès de ce mode de stockage l'ARGENTINE fait alors construire de nombreux autres puits sur son territoire qui à eux tous peuvent abriter environ 2 millions de tonnes de grains. Puis le PARAGUAY, le VENEZUELA et l'URUGUAY s'équipent à leur tour.

Après 1950, 8 grands puits expérimentaux sont construits en AFRIQUE (au TANGANYIKA, au NYASALAND, en RHODÉSIE DU SUD, en COTE D'OR, au NIGÉRIA au SOUDAN ANGLAIS) et à CHYPRE.

Les résultats obtenus au TANGANYIKA, permettent de projeter la construction de puits pour stocker 11 000 tonnes dans cette région, et 10 000 tonnes d'avoine à CHYPRE.

Oxley et M. Hyde (6) (17) (18), dans leurs articles très documentés donnent les détails de construction de ces puits et des expériences qui y furent faites.

Dans tous les cas, les essais effectués sur des grains secs (Nyasaland : maïs à 9,9-12,3 p. 100 d'eau, 484 jours. — Tanganyika : maïs 10,8 à 12,4 p. 100 d'eau, 446, 241, 99 jours) donnent pleine satisfaction en ce qui concerne la protection du grain contre les insectes. Mais quelques pertes (8 p. 100 au maximum) (odeur de moisi, de fermentation) sont à déplorer lorsque les constructions ne sont pas d'une étanchéité parfaite.

Il n'en reste pas moins vrai que les essais poursuivis en Amérique comme en Afrique ont prouvé la grande efficacité pratique du stockage souterrain étanche et sa supériorité sur les autres procédés de conservation.

De plus, comme nous le verrons ultérieurement, le coût de la construction et de la main-d'œuvre est plus bas dans le cas des puits souterrains que dans les autres procédés de stockage.

2° Silos aériens.

En Afrique du Nord, Fabre et Millon (19) imperméabilisent intérieurement et extérieurement les parois et les orifices de petites maisons indigènes avec un ciment vulcanisé ; l'étanchéité obtenue est excellente et la conservation du grain emmagasiné dans ces silos satisfaisante.

En 1935-1939, Blanc (20-21) expérimente des silos aériens hermétiques à parois métalliques minces, bonnes conductrices de la chaleur.

Des sondes thermoélectriques enregistreuses permettent de suivre les variations journalières et saisonnières de la température dans la masse du grain. De même la pression et la nature des gaz, l'état du grain après l'ensilage et sa valeur boulangère sont l'objet d'observations minutieuses.

En outre, Blanc utilise des fûts métalliques de 100-200-300-400-500-600 litres et un petit cylindre en Eternit de 30 quintaux. Les blés ensilés ont des teneurs en eau respectivement égales à 15-16,2 et 10,52 p. 100.

Les principales conclusions de Blanc sont les suivantes : les variations journalières de la température extérieure ne sont pas ressenties dans la masse du grain dès que le silo peut loger 150 litres de grain par mètre carré de surface. « Dans un silo, plus grand, contenant 615 litres de grain par mètre carré de surface, seule la série des variations saisonnières, dont la période est d'une année, a pu se transmettre très régulièrement jusqu'au sein de la masse, avec un amortissement de l'ordre de

65 p.100 et un décalage dans le temps d'environ 2 mois. » Désormais la construction en maçonnerie enveloppant le silo métallique n'apparaît plus comme indispensable, et le choix entre le silo hermétique aérien ou souterrain devient une question d'opportunité.

Le blé ayant 15 p. 100 d'eau à l'ensilage, s'est bien conservé pendant 13 mois, sain et sans mauvaises odeurs, il a donné un pain de qualité courante.

Les résultats obtenus avec le blé à 16 p. 100 sont également très satisfaisants au bout de 19 mois. De même la conservation en fûts donne satisfaction. BLANC cependant constate dans quelques-uns une légère odeur alcoolique qui disparaît rapidement à l'air. La teneur en gaz carbonique à l'intérieur des silos n'a pas dépassé 20 p. 100, le pouvoir amylolytique a diminué, et il y a eu saponification des matières grasses. Dans l'ensemble la conservation en fûts n'a occasionné que peu de variations. Malheureusement le détail des analyses faites sur les blés conservés en silo n'a pas été publié.

En 1949 COSTAZ (22) stocke de l'orge humide dans un silo hermétique en acier. Après 5 mois de conservation le grain est « parfaitement sain et coulant à la main » ; de plus les essais de germination sont excellents (faculté germinative chiffrée à 98 p. 100 le 7e jour, ce pourcentage étant maintenu au 14e jour).

Actuellement deux types de silos étanches aériens sont répandus en FRANCE. Leur importance varie suivant qu'ils sont destinés aux petites exploitations individuelles, ou aux coopératives. Les uns sont des cylindres d'acier, les autres des cellules hexagonales groupées par 4 ou 12 contenant 100 à 150 tonnes. L'ensemble pouvant rester à l'air libre, sans protection, ou couvert pour la commodité des travailleurs.

Il est important que les cellules soient suffisamment pleines, sinon il y a risque de condensation sur les parois supérieures non garnies du silo, surtout lors de l'ensilage de grains humides. De plus une quantité minimum de grain est nécessaire, afin que les proportions en gaz carbonique et oxygène nuisible aux insectes puissent être rapidement atteintes dans l'espace intergranulaire (voir principe de l'ensilage hermétique).

Après l'enquête qu'elle a menée en FRANCE auprès des utilisateurs, HYDE conclut que l'ensilage hermétique permet une meilleure conservation du grain humide que les autres méthodes d'ensilage. En effet, elle a constaté que ces silos servaient assez fréquemment à conserver du grain humide (18-19 p. 100 d'eau) (pour des durées non précisées). Mais la teneur en eau de 18-19 p. 100 doit être considérée comme une limite supérieure, en dessous de laquelle il est prudent de rester.

En étudiant l'évolution biochimique des blés conservés en silos étanches, du type de ceux que l'on rencontre en France, OXLEY et son équipe ont cherché une solution au problème posé par la conservation

des blés anglais, souvent très humides à la récolte (pouvant atteindre 30 p. 100) et des blés tropicaux des régions chaudes et humides.

Les essais, qu'ils ont entrepris sur blé et orge, précisent en partie les conditions d'utilisation de ce mode de stockage en fonction de la destination des grains (semence, brasserie, meunerie, alimentation animale). Dans ce dernier cas, les auteurs estiment que la méthode peut être utilisée même pour des grains très humides. Néanmoins, en raison du peu d'expériences existant actuellement dans ce domaine, une grande prudence s'impose et il ne semble pas souhaitable, dans l'intérêt même des éleveurs, de laisser se répandre une telle pratique.

La discussion détaillée de ce point de vue et l'étude de l'évolution technologique et biochimique des blés conservés en cellules étanches feront l'objet d un chapitre ultérieur.

III. — Conclusions.

Nous venons de tracer un bref historique de l'évolution des silos « étanches » de l'antiquité à nos jours.

Ce mode de stockage s'est, en fait, surtout répandu dans les pays où les conditions climatiques permettent la récolte de grains secs, et, dans ce cas la protection a spécialement besoin d'être efficace contre les insectes et les rongeurs. Dans ces régions, les stockages de longue durée facilitent l'utilisation progressive des récoltes et évitent les périodes de disette.

C'est souvent en périodes de guerre, en prévision de blocus ou à cause de difficultés d'exportation, que, dans certains pays, on a recours à ce stockage à très long terme. Cependant, actuellement il est permis de se demander si le silo étanche peut également servir, dans des conditions strictement définies, comme moyen de stockage d'attente avant séchage, et de stockage de moyenne durée (6 mois à 1 an) de façon courante.

Les silos souterrains de construction assez rustique, présentent indéniablement certains avantages (isothermie, prix de revient peu coûteux), mais ne sont réellement utilisables que dans la mesure où la cavité asséchée au moment de l'ensilage du grain à faible teneur en eau reste sèche pendant toute la durée de l'opération. A l'heure actuelle, au moins en Europe, l'orientation semble se dessiner en faveur des silos aériens, dans la mesure où la masse est suffisamment importante vis-à-vis de la surface, pour être faiblement influencée par les variations de température extérieure.

L'emploi de ce mode de stockage pour des grains trop humides et une mauvaise réalisation pratique des conditions d'étanchéité ont provoqué des échecs assez retentissants qui ont parfois détourné de l'emploi du silo « étanche ».

En fait, l'étanchéité de tous ces silos anciens et primitifs, souterrains ou aériens, n'était, dans la plupart des cas, pas absolue. On retrouvait souvent près de l'ouverture une couche d'insectes et des grains détériorés. Les techniques que l'on peut actuellement mettre en œuvre offrent sans doute plus de sécurité en ce qui concerne l'herméticité.

Les conclusions tirées des essais effectués au début du XIXe siècle étaient peut-être un peu trop optimistes, l'aspect du grain sortant de silos étanches étant trompeur et les critères d'utilisation étant sûrement moins stricts qu'à l'heure actuelle. Les conditions d'utilisation à respecter ont été déjà généralement bien définies par d'Arcet, Doyère, Müntz, et plus récemment sur des bases scientifiques mieux établies, par Blanc, Lopez, Hyde et Oxley. Cependant on manque encore d'études systématiques en fonction des divers facteurs qui interviennent et une meilleure connaissance du mécanisme des phénomènes complexes qui se produisent est encore nécessaire pour établir clairement les limites et les bases solides de l'ensilage hermétique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Schribaux (E.). — Conservation des grains. Revue de l'Intendance, 1912.
(2) Vayssière (P.). — L'ensilage hermétique et la conservation des grains. Conf. Centre de Perfectionnement technique. n° 1235, 1944.
(3) Beguillet. — Traités des subsistances et des grains qui servent à la nourriture de l'homme. II, 1802.
(4) L'abbé Poncelet. — Histoire naturelle du froment. 1779.
(5) Doyère (M. L.). — Conservation des grains par l'ensilage. Guillaumin Ed., 1862.
(6) Hall (D. W.), Haswell (G. A.) and Oxley (T. A.). — Underground storage of grain. Published by her majesty's stationery office for the colonial office, 1956.
(7) Diffloth (P.). — Agriculture générale « Les Récoltes ». J. B. Baillière et Fils Ed., 1921.
(8) Baraton (P.). — L'emmagasinage et la conservation des grains et des farines. Revue du service de l'Intendance militaire, n° 212, Juillet-Août 1928.
(9) de Lasteyrie. — Des fosses propres à la conservation des grains, et de la manière de s'en servir. Imprimerie royale, 1819.
(10) Ternaux. — 1820)
de Rigny. — 1821.
Dejean. — 1826.
Demarcy. — 1838.
} in Diffloth (7).
(11) d'Arcet. — Exposé à la Société Nationale d'Agriculture, 1841.
(12) Jossoud (M.). — Conservation des grains par l'ensilage il y a cent ans. *Agriculture*, n° 210, p. 77-85, 1959.
(13) Haussmann père. — 1861, in Diffloth (7).
Louvel. — in Diffloth (7).
(14) Müntz (M. A.). — Étude sur la conservation des graines par l'ensilage. *Ann. Inst. Agr.*, n° 4, p. 19-73, 1878-1879.
(15) Shellenberger (J. A.) and Fenton (F. C.). — Underground grain storage. *Mill. Prod.*, **17**, 7-5, 1952.

(16) Lopez (C. O.). — La conservacion de los cereales y les silos subterraneos. *Inst. Agr. Argent. Resenas*, **7**, 43-27, 1946.
(17) Hall (D. W.) and Hyde (M. B.). — The modern method of hermetic storage. *Tropical Agriculture*, **31**, p. 149-160, 1954.
(18) Oxley (T. A.). — Grain storage in tropical climates. World crops, **7**, n° 12, 1955.
(19) Fabre et Millon (E.). — Sur un ciment vulcanisé. Note non publiée, 1855.
(20) Blanc (A.). — Essais de conservation de blé en atmosphère confinée. C. R. Ac. Agr., 8 juin, p. 625, 1938.
(21) Blanc (A.). — Les premiers résultats d'une nouvelle série d'essais de conservation de blé en atmosphère confinée. C. R. Ac. Agr., 22 novembre, p. 1-11, 1939.
(22) Costaz in Reimbert (M. A.). — Silos, traité théorique et pratique. Eyrolles Ed., 1956.
(23) Oxley (T. A.) and Hyde (M. B.). — Recent experiments on hermetique storage of Wheat. 3rd international Bread Congress, Hamburg, p. 179-182, 1955.

(Nous remercions M. Guilbot pour les conseils qu'il nous a donnés au cours de ce travail, ainsi que M. Vayssière pour la documentation qu'il a aimablement mise à notre disposition.

LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE TARTRIQUE

PAR

P. DUPUY

Station de Technologie végétale, Versailles

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

CHAPITRE I

Quelques propriétés chimiques des isomères de l'acide tartrique.

A. — Les réactions chimiques productrices d'acide tartrique et remarques sur son isomérie.

B. — Transformation de l'acide tartrique par voie chimique.
Oxydation par l'air et l'eau oxygénée.
Déshydratation.

CHAPITRE II

Métabolisme de l'acide tartrique par les microorganismes.

A. — Production de l'acide tartrique.
1° Par les moisissures.
2° Par les levures.
3° Par les bactéries.

B. — Dégradation de l'acide tartrique.
1° Par les moisissures.
2° Par les levures.
3° Par les bactéries.
Premières recherches.
Test d'assimilation des tartrates dans la systématique bactérienne.
Bactéries isolées du vin.
Travaux récents.

CHAPITRE III

Métabolisme de l'acide tartrique par les végétaux.

1° Les plantes à acide tartrique.
2° Évolution de l'acide tartrique dans les végétaux.
Transamination.
Assimilation.
Respiration.
3° Circulation de l'acide tartrique dans les plantes.

CHAPITRE IV

Métabolismes de l'acide tartrique par les animaux.

CHAPITRE V

Les enzymes du métabolisme de l'acide tartrique.

1° Transport actif des différents isomères.
2° Phosphorylation de l'acide tartrique.
3° Activité des déshydratases.
4° Activité déhydrogénasique.
5° Relation de l'acide tartrique avec les métabolismes généraux.
Schéma de dégradation de l'acide tartrique.
Explication du schéma de dégradation de l'acide tartrique.

Conclusion.

Références bibliographiques.

INTRODUCTION

Le métabolisme de l'acide tartrique n'a pas donné lieu jusqu'ici, à notre connaissance, à une mise au point. Il faut peut-être attribuer cet état de fait aux données très fragmentaires que nous possédons sur ce sujet. Jusqu'à ces cinq dernières années n'existaient que des études peu poussées dont les conclusions dépassaient parfois très largement les évidences expérimentales.

L'aspect biochimique de la question n'a été abordé que récemment dans des travaux qui font intervenir les techniques de l'enzymologie et l'utilisation de molécules marquées.

Le retard qu'ont pris nos connaissances sur ce point particulier est d'autant plus frappant que le métabolisme de corps très voisins, comme l'acide malique ou l'acide oxalacétique, nous est familier. Placé en dehors des grandes voies du métabolisme, l'acide tartrique paraît un peu oublié des biochimistes. Notre but est d'analyser ici l'abondante bibliographie qui le concerne et de mettre en évidence les divers mécanismes qui prennent part à sa synthèse et à sa dégradation.

Nous avons été aidé dans ce travail par deux importantes études : une revue de DEIBNER (1956) concernant l'oxydation chimique, et la thèse de LA RIVIÈRE (1958) traitant du métabolisme microbien des isomères de l'acide tartrique.

Cette mise au point commence par un exposé concernant nos connaissances sur l'isomérie de l'acide tartrique. Ceci est nécessaire pour dissiper certaines ambiguïtés qui existent sur ce sujet. On a aussi analysé dans ces préliminaires les connaissances concernant les réactions purement chimiques de formation et d'oxydation de l'acide tartrique, qui sont indispensables pour discuter les observations biologiques.

On a ensuite passé en revue le métabolisme de l'acide tartrique par les microorganismes, les plantes et les animaux supérieurs. Dans chaque cas particulier, on a séparé ce qui concernait la production de l'acide tartrique de ce qui avait trait à sa dégradation.

Les études enzymologiques se rapportant à l'acide tartrique ont été groupées, à cause de leur importance, dans un chapitre séparé.

La conclusion de cette étude sera résumée dans un schéma montrant les voies métaboliques possibles et indiquant comment elles peuvent se relier au métabolisme général des êtres vivants. Bien entendu, ce schéma concrétisera un stade de notre connaissance ; il sera sûrement remis en cause par de nouvelles recherches, mais nous pensons qu'il peut aider à acquérir une vue synoptique de cette question dans son état actuel.

CHAPITRE I

QUELQUES PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES ISOMÈRES DE L'ACIDE TARTRIQUE

A — Réactions chimiques productrices d'acide tartrique et remarques sur son isomerie

D'origine très ancienne, puisqu'il conserve le nom que lui ont donné les alchimistes arabes, l'acide tartrique possédait autrefois une grande importance pratique. C'était en effet l'un des rares acides que l'on pouvait extraire en quantité importante et qui, par suite de son état solide, offrait des facilités de transport plus grandes que d'autres acides liquides.

A l'époque de Pasteur, de nombreuses usines préparaient de l'acide tartrique cristallisé, à partir des tartres récupérés dans les cuves de conservation des vins. Le produit était surtout utilisé dans les bains de teinture. Il n'est donc pas étonnant que ce soit sur ce corps qu'ait été mis en évidence pour la première fois le phénomène d'isomérie optique. PASTEUR (1853) montre que l'acide tartrique peut exister sous quatre formes différentes :

L'acide tartrique droit.

L'acide tartrique gauche.

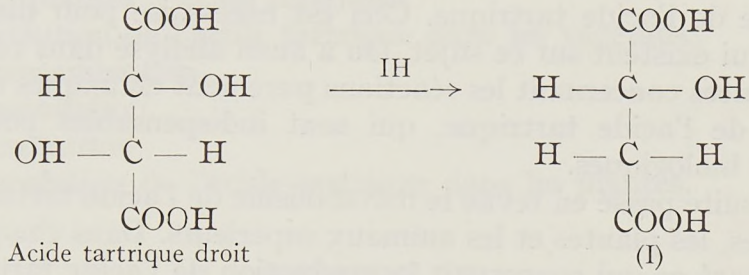
L'acide tartrique racémique qui est un mélange équimoléculaire des précédents.

L'acide tartrique inactif par nature, appelé ensuite mésotartrique.

La nomenclature reste parfaitement claire jusqu'au moment où, dans un souci de normalisation, on a relié la structure de ces isomères à celle des deux

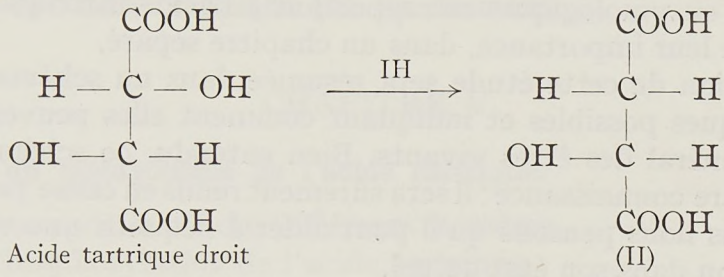
isomères du glycéraldéhyde. Fischer (1896) montre que la réduction du tartrate droit par l'acide iodhydrique conduit à l'isomère énantiomorphe de l'acide malique naturel. Comme ce dernier a la structure L, il faut en conclure que l'acide tartrique droit possède la configuration D.

Si la réduction porte sur le carbone 3, on a :



Acide tartrique droit (I)

et si elle porte sur le carbone 2,



Acide tartrique droit (II)

Les structures (I) et (II) sont superposables par rotation de 180° dans le plan de la feuille, elles représentent donc des composés identiques. Ceci indique que les deux carbones asymétriques de l'acide tartrique possèdent la même configuration.

Du côté des oses, les relations sont les suivantes.

L'acide tartrique droit peut se préparer à partir du D-glucose comme l'ont montré de très nombreux chercheurs. Barch (1932), Isbell et Holt (1945) obtiennent le tartrate droit par oxydation de l'acide D-5-cétogluconique. Il est donc évident que les carbones asymétriques ont la même configuration dans l'acide tartrique droit que dans les atomes 2 et 3 du D-glucose.

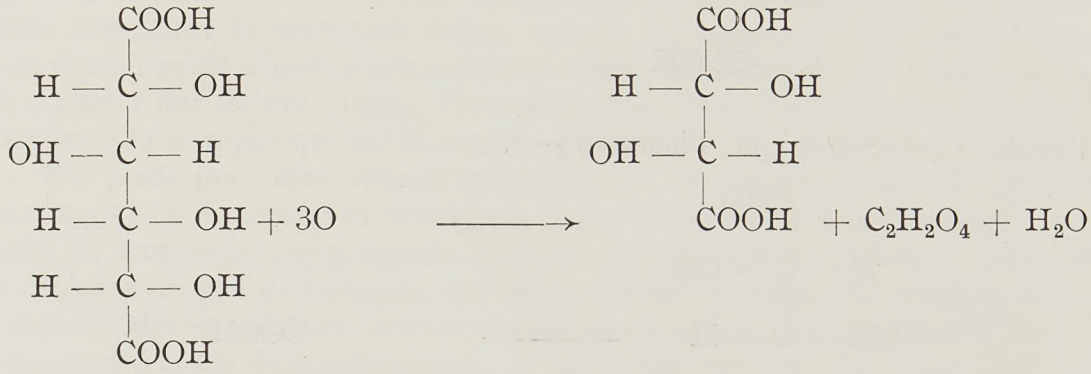
En utilisant la diffraction par des rayons X d'une longueur d'onde telle qu'elle n'excite que le rubidium d'un cristal de tartrate double de sodium et rubidium, Bijovet, Peederman et Van Bommel (1951) ont obtenu un diagramme, qui permet de différencier les isomères droit et gauche. Ils montrent ainsi que la représentation de l'acide tartrique droit qui, pour Fischer, découlait d'une simple convention, correspond à la disposition réelle des atomes.

Toutes ces raisons sont en faveur de l'écriture D (+) tartrique pour l'isomère droit. Cette façon de voir n'est pas adoptée par tout le monde, en particulier par Crane (1953), qui applique la règle générale suivante : « Les hydrates de carbone dont l'atome de carbone asymétrique portant le numéro le plus élevé a la même configuration que celui du D (dextro) glycéraldéhyde, appartiennent à la série de configuration D ». Dans ces conditions, il est certain que l'atome de carbone 3 de l'acide tartrique dextrogyre possède la configuration L. Cependant l'application de cette règle à un corps qui n'est pas un hydrate de carbone nous paraît abusive d'autant plus qu'elle est en contradiction avec la filiation chimique établie. Il s'ensuit une certaine confusion dans l'attribution des préfixes D et L aux acides tartriques à cause de la présence de deux centres d'asymétrie. Comme le souligne Buchanan (1959), l'ambiguïté dans la désignation des isomères de l'acide tartrique est une conséquence inévitable de la notation

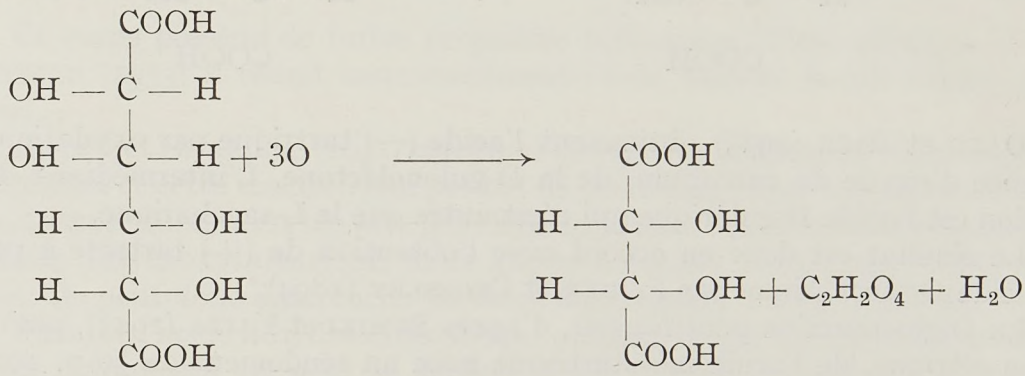
de configuration couramment admise. En attendant, il y a intérêt à n'utiliser, comme le fait La Rivière (1958) que les signes + et — qui se rapportent uniquement au pouvoir rotatoire qu'il est facile de déterminer expérimentalement.

L'acide tartrique se forme assez facilement dans les réactions de dégradation des glucides. Au début, cela a permis de relier sa structure à celles de certains composés voisins. Plus tard, les études ont été reprises en vue de trouver un procédé de préparation chimique de l'acide tartrique. Il ne semble pas cependant que les solutions proposées aient reçu d'applications pratiques.

Fischer et Crossley (1894) montrent que l'acide tartrique peut se former dans l'oxydation permanganique des acides saccharique et mucique. L'acide saccharique donne l'isomère (+).

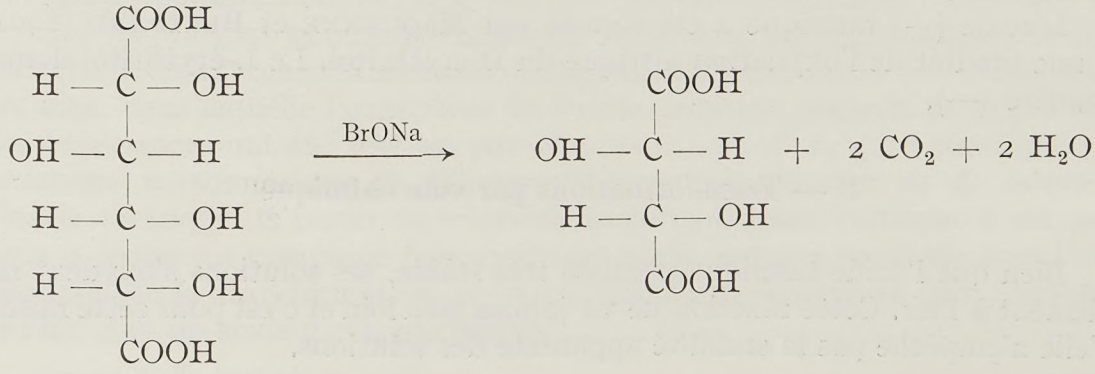


et l'acide mucique donne l'isomère méso (cet acide mucique serait appelé à présent acide mannarique).

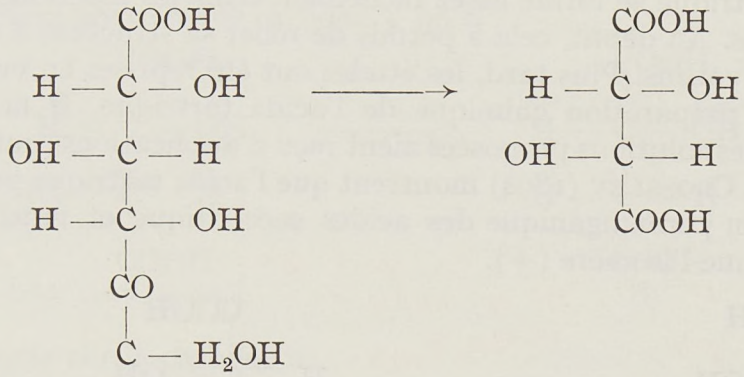


Fisher (1896) montre que c'est encore l'isomère droit qui se forme lors de l'oxydation par l'acide nitrique du méthyltétrose dérivé du D-rhamnose.

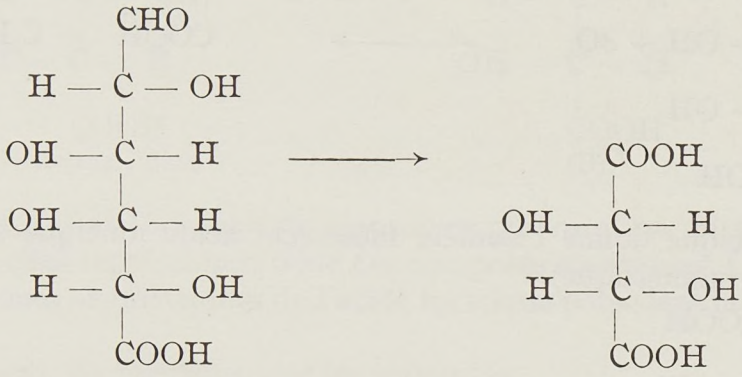
En revanche, l'acide tartrique gauche se produit d'après Bergmann (1921) lors de l'oxydation du même acide saccharique par l'hypobromite. Ceci s'explique parce que dans ce cas, ce sont les deux carboxyles terminaux qui se détachent, selon la formule :



Les acides monocarboxyliques sont scindés de la même façon en milieu alcalin. Ainsi Isbell et Holt (1945) montrent que l'acide 5-cétogluconique fournit l'acide (+) tartrique.



et l'acide D-galacturonique, l'isomère (—).



Dale et Rice (1933) obtiennent l'acide (—) tartrique par oxydation, en présence d'oxyde de vanadium, de la D-gulonolactone. L'intermédiaire de la réaction est l'acide D-gularique qui n'est autre que le L-saccharique.

Le résultat est donc en accord avec l'obtention de (+) tartrate à partir de l'acide D-saccharique par Fisher et Crossley (1894).

La D-glucosamine peut fournir, d'après Sumiki et Yaita (1943), par oxydation nitrique, de l'acide mésotartrique avec un rendement de 50 p. 100 en même temps qu'une petite quantité de (±) tartrate.

L'oxydation du saccharose en présence d'oxyde de vanadium comme catalyseur, peut fournir jusqu'à 22 p. 100 d'acide tartrique, selon Pal et Saha (1953). Cependant la formation de l'acide tartrique dans la dégradation des glucides ne semble pas être un phénomène tout à fait général, puisque Ohashi et Takahashi (1950) ne sont pas parvenus à le mettre en évidence lors de la décomposition en milieu alcalin de l'amidon hydrolysé.

L'acide (+) tartrique a été signalé par Maquenne et Bertrand (1901) comme produit de l'oxydation nitrique du D-erythritol. Le L-érythritol donne l'isomère (—).

B — Transformations par voie chimique

Bien que l'acide tartrique paraisse très stable, ses solutions s'oxydent rapidement à l'air. Cette réaction ne va jamais bien loin et c'est pour cette raison qu'elle n'empêche pas la stabilité apparente des solutions.

Oxydation par l'air et l'eau oxygénée.

DUCLAUX (1892) signale que la concentration en acide tartrique et aussi en sucre, diminue dans du milieu de Raulin, lorsqu'on le laisse à la lumière solaire. Après un mois au soleil, une solution contenant 3,26 g/l d'acide tartrique n'en renferme plus que 2,21g/l Le milieu soumis à la distillation fournit 0,64 g/l d'acide formique. Cette expérience ne permet pas de décider si l'acide formique provient de l'acide tartrique ou du glucose.

FENTON (1894) découvre que l'acide tartrique mis en solution alcaline en présence d'eau oxygénée et de sulfate ferreux donne une coloration bleue. Cette réaction est due à la formation d'un corps que FENTON (1905) avait cru posséder la structure de l'acide dihydroxymaléique. En réalité, il s'agit d'un acide possédant la structure trans, comme l'a démontré HARTREE (1953) : c'est donc l'acide dihydroxyfumarique. Cette structure a été confirmée pour les cristaux par GUPTA (1953). Nous adoptons dans ce travail la dénomination dihydroxyfumarique qui est la seule correcte.

Cet acide peut être obtenu cristallisé par les méthodes décrites par FENTON (1905) et NEUBERG et SCHWENK (1915). Même sous cette forme il est instable, et AXELROD (1955) signale qu'il est, à température ordinaire, susceptible de dégager du gaz carbonique, qui fait exploser les ampoules scellées où il est conservé. Mis en solution, son oxydation se poursuit spontanément à l'air avec formation d'acide dicétosuccinique. D'après GENEVOIS et GAY (1939) on aurait en solution un équilibre entre la forme énolique et cétonique.

$$COOH - CHO = CHO - COOH \leftrightarrows COOH - CO - CHOH - COOH.$$

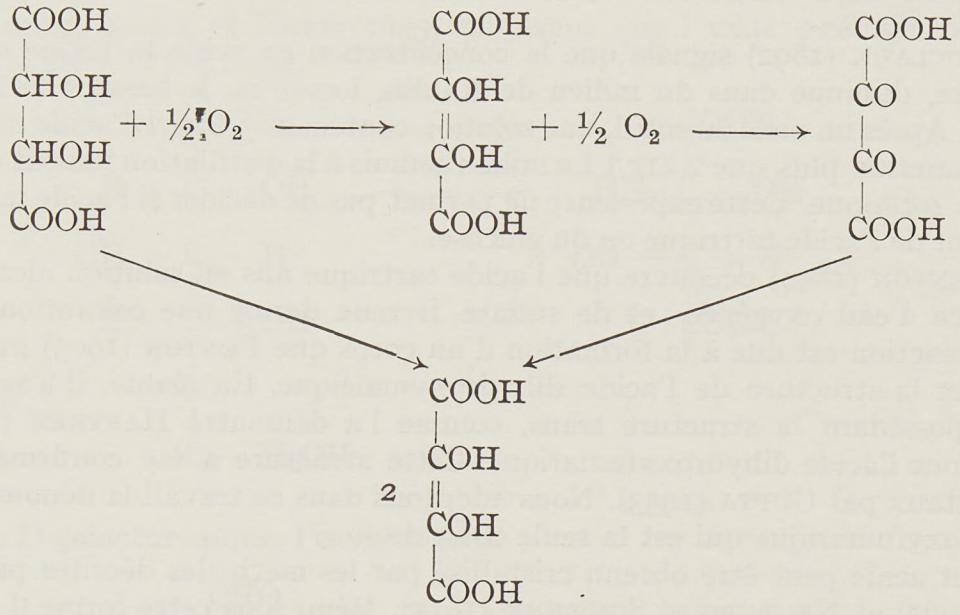
Ce corps possède de fortes propriétés réductrices. C'est ainsi que, d'après HARTREE (1953) il réduit instantanément l'iode, comme le fait l'acide ascorbique.

GATET et GENEVOIS (1941) montrent qu'il peut réduire le 2-6 dichlorophénol indophénol et cette réaction leur permet de mettre au point une méthode de dosage. Cette réduction est bloquée par l'hydroxylamine qui se combine rapidement à l'acide dihydroxyfumarique, alors que ce n'est pas le cas pour l'acide ascorbique. On peut donc différencier les deux acides grâce à cette méthode.

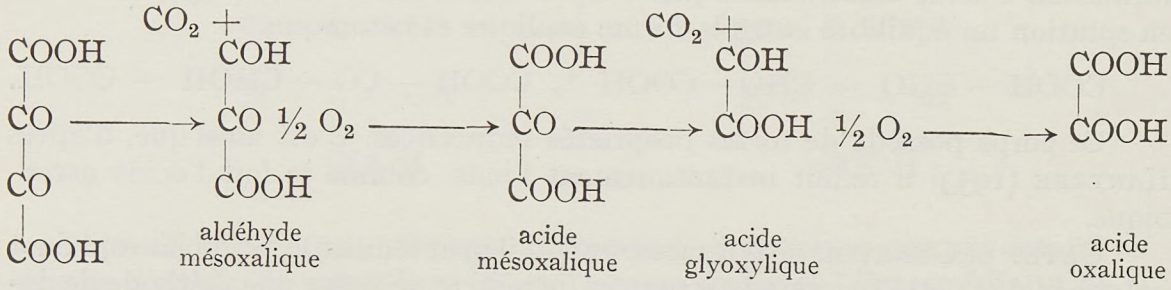
Puisque l'acide dihydroxyfumarique est capable de réduire le 2-6 dichlorophénol indophénol, on peut se demander s'il ne réduit pas aussi le diphosphopyridine nucléotide. Cette question n'a jamais été abordée à notre connaissance, elle est cependant d'une importance primordiale pour pouvoir interpréter les travaux enzymatiques qui tendent à montrer l'existence d'une déshydrogénase de l'acide tartrique, dont le DPN est justement la coenzyme. Il est vraisemblable que les solutions d'acide tartrique employées contiennent, toujours des petites quantités d'acide dihydroxyfumarique, qui sont peut-être capables de réduire spontanément le DPN sans intervention d'enzymes.

Ces oxydations purement chimiques présentent un grand intérêt, et elles ont servi à GENEVOIS et RIBEREAU (1938) à édifier une théorie du vieillissement des vins, dans laquelle l'oxydation de l'acide tartrique jouerait un grand rôle. Les expériences ont été reprises par RODOPOULO (1952 a) qui a étudié avec la technique manométrique de Warburg l'oxydation des vins et de solutions d'acide tartrique. A partir de solutions oxydées d'acide tartrique il est parvenu à isoler un complexe ferreux de cet acide, jaune et insoluble dans l'eau, qui catalyse la transformation en acide dihydroxyfumarique par l'oxygène de l'air, puis en acide dicétosuccinique.

On peut imaginer les chéma suivant :



A partir de l'acide dicétosuccinique interviennent ensuite des décarboxylations mesurables à l'appareil de Warburg, qui conduisent à la formation d'acide oxalique suivant le schéma :



Ces produits de l'oxydation de l'acide tartrique peuvent être mis en évidence par les méthodes suivantes :

— pour les acides dihydroxyfumarique et dicétosuccinique, méthode de Schmalfuss et Barthmeyer (1926),

— pour l'acide dicétosuccinique, méthode de Baraud (1951) utilisant la tartrazine obtenue par condensation de la p-sulphophényl hydrazine,

— pour l'acide glyoxylique, méthode de Fosse et Hieule (1924) utilisant la réaction de la phénylhydrazine et du ferricyanure en milieu chlorhydrique,

— pour l'acide oxalique, méthode de chromatographie sur papier décrite par Rodopoulo (1952 b).

Ainsi que l'indique Deibner (1956), une controverse paraît exister sur le rôle des ions ferreux et ferriques comme catalyseurs de ces réactions. La majorité des auteurs pense avec Fenton (1894) que seuls les sels ferreux sont catalyseurs. D'autres croient que les sels ferriques interviennent aussi. On peut supposer, comme le fait Rodopoulo (1951) que les ions ferriques peuvent être réduits par les acides intermédiaires facilement oxydables. Ils interviendraient donc par les ions ferreux qu'ils engendrent.

On doit se demander quelle est l'importance quantitative de cette série de réactions. D'après les analyses faites par Rodopoulo (1952 b), l'équilibre doit être fortement en faveur de l'acide tartrique, puisque dans les vins qu'il a analysés, il ne décèle pas plus de 1 millimolécule d'acide oxalique pour 40

d'acide tartrique. Il reconnaît que lorsqu'on ajoute au vin le complexe tartrique ferreux catalyseur de l'oxydation, la vitesse d'oxydation reste faible, ce qui pourrait être dû à sa réaction avec des quinones qui le transforme en complexe ferrique dépourvu de propriétés catalytiques.

Les dosages d'acide dihydroxyfumarique faits par GATET et GENEVOIS (1941), dans des vins blancs, n'en ont décelé au maximum que 100 mg par litre, quantité assez voisine de la m molécule/l trouvée par RODOPOULO (1952 *b*). Un doute existe cependant au sujet de la présence des acides dihydroxyfumarique et dicétosuccinique dans le vin. En effet BARAUD (1954) n'est pas parvenu à les mettre en évidence dans les échantillons de vin de Bordeaux qu'il a étudiés, bien que la méthode à la tartrazine utilisée par Baraud (1953) soit susceptible de déceler 1 mg/l de ces produits. Il a cependant trouvé des corps qui proviennent vraisemblablement de leur dégradation : les acides mésoxalique, glyoxylique et le glyoxal qui peuvent dériver de l'acide dicétosuccinique, et aussi l'aldéhyde glycolique qui peut venir de l'acide dihydroxyfumarique. L'explication proposée par cet auteur est que la vitesse de destruction de ces deux acides est au moins aussi grande que leur vitesse de formation. L'expérience montre en effet que l'acide dicétosuccinique ajouté au vin disparaît rapidement, mais en donnant de l'acide oxalique. Ce dernier acide n'a pu être mis en évidence dans les vins français, alors que RODOPOULO (1952 *b*) en avait dosé 85 mg/l dans les vins russes. Les recherches de BARAUD (1954), les dernières en date, laissent encore un doute sur l'existence de ces deux acides dans le vin et donc sur le rôle que l'on peut attribuer à l'acide tartrique dans le vieillissement.

Déshydratation.

Le chauffage de l'acide tartrique au-dessus de son point de fusion donne naissance à des anhydrides désignés sous le nom technique d'acide métatartrique. Dans les produits de distillation sèche de l'acide tartrique, on trouve de l'acide pyruvique. Il serait formé par la décomposition de l'acide oxalacétique, produit de la déshydratation de l'acide tartrique.

Le passage de l'acide tartrique à l'acide oxalacétique a été obtenu chimiquement par WOHL et OSTERLIN (1901) à la suite des transformations suivantes :

Acide tartrique droit
↓
Ester diacétique
↓
Anhydride de l'ester diacétique
↓
Combinaison avec 1 molécule de pyridine
↓
Acide oxalacétique par dissolution dans l'acide sulfurique.

Les études que nous venons d'analyser suggèrent qu'il peut exister des rapports entre l'acide tartrique et les produits de la dégradation des glucides. Cette opinion a été souvent exprimée en conclusion des travaux biochimiques et il faut reconnaître qu'elle est tout à fait compatible avec les données de la chimie.

Le deuxième point important est la transformation possible de l'acide tartrique en acide oxalacétique. On verra en effet que cet acide se rencontre assez souvent comme premier produit d'oxydation biologique de l'acide tartrique.

Enfin, il faut noter que l'acide dihydroxyfumarique est un produit normal de l'oxydation chimique de l'acide tartrique, or, à la lumière de plusieurs travaux concordants, cet acide semble répandu chez les végétaux. En outre, son métabolisme est assez actif. Il n'est donc pas étonnant que HARTREE (1953) trouve digne d'intérêt pour un biochimiste le fait que, la lumière solaire catalyse la formation d'acide dihydroxyfumarique en présence de tartrate ferreux et d'air.

CHAPITRE II

MÉTABOLISME DE L'ACIDE TARTRIQUE PAR LES MICROORGANISMES

Les travaux concernant le métabolisme de l'acide tartrique par les microorganismes sont nombreux. Pour la facilité de l'exposé, on a groupé ceux qui s'occupent de sa synthèse dans une première partie, et dans une seconde partie, ceux qui concernent sa dégradation. A l'intérieur de chaque division, on passe successivement en revue ce qui se rapporte aux moisissures, aux levures et aux bactéries.

A — Production de l'acide tartrique

1° Par les moisissures.

Les moisissures sont des organismes dont l'aptitude à la production d'acides organiques paraît particulièrement bien développée. C'est habituellement l'acide citrique qui est le produit principal de ce métabolisme particulier, et il faut dire qu'il a beaucoup retenu l'attention à cause de l'intérêt économique que représente sa production.

A côté de l'acide citrique, d'autres acides organiques ont été mis en évidence. Dans cette liste assez longue, on retrouve tout d'abord ceux qui servent d'intermédiaire dans le cycle de Krebs : malique, fumarique, succinique. Les autres intermédiaires, moins stables, passent inaperçus, du fait de leur faible concentration ou des difficultés de caractérisation qu'ils présentent. A côté d'eux, on trouve avec une certaine fréquence les acides oxalique et tartrique, qui n'interviennent dans aucune des grandes voies générales du métabolisme, du moins dans celles que nous connaissons. Pour cette raison, on les regarde assez souvent comme des métabolites de déchet.

Le tableau I indique les travaux au cours desquels la présence d'acide tartrique a été signalée. C'est surtout dans le genre *Aspergillus* qu'a été décelée la production d'acide tartrique. Les deux autres espèces indiquées dans le tableau, *Fusarium lini* et *Giberella saubinetii* sont des formes très voisines puisqu'on pense que les *Fusarium* pourraient être les formes conidiennes des seconds. Tous ces microorganismes appartiennent à la classe des Ascomycètes.

Deux substrats peuvent servir à la production de l'acide tartrique : le glucose et l'éthanol. Jusqu'ici, une seule hypothèse a été avancée par ROTINI, DAMMAN et NORD (1936) pour indiquer par quelle voie se fait cette synthèse. Il y aurait d'abord oxydation de l'éthanol en acide acétique et condensation de deux molécules en C_2 conduisant aux acides du cycle de Krebs. Cette façon

TABLEAU I

Production de l'acide tartrique par les microoganismes

Espèce	Substrat	Acides trouvés								Auteurs
		Tartrique	Glycolique	Oxalique	Succinique	Citrique	Fumarique	Malique	Lactique	
Aspergillus glaucus	glucose	+		+	+	+	+	+		SUMIKI (1929)
Aspergillus niger	glucose ?	+		+	+	+		+		KINOSHITA (1927)
Fusarium lini (ascomycète)...	pas de N assimilable éthanol	+							+	ROTINI, DAMMANN et NORD (1937)
Aspergillus niger (plusieurs souches)	éthanol	+						+		BERNHAUER et BOCKEL (1932)
Giberella saubinetii (ascomycète)	glucose	+		—		+				HESSLER et GORTNER (1937
Aspergillus niger	glucose	+		+			+	+		BUTKEVITCH et MELNIKOVA (1943)
Moisissures	amidon	+		+		+		+		FALCK et KINGMA (1924)
Acetobacter.....	glucose	+		+						JACKSON, KOEPSELL
Pseudomonas fluorescens	5-céto-gluconate	+	+							LOCKWOOD, NELSON, STODOLA (1949)
Pseudomonas fluorescens	5-céto-gluconate	+								LOCKWOOD et NELSON (1951)
Acetobacter suboxydans	glucose	+								KAMLET (1943)

de voir est en accord avec la réaction de condensation de 2 C_2 étudiée par Foster et Carson (1950) avec *Rhizopus nigricans*. Butkevitch et Melnikova (1943), qui ont trouvé de l'acide tartrique en petite quantité lors de la transformation des hexoses en acide oxalique, pensent qu'il représente un stade intermédiaire dans cette dégradation. Cleland et Johson (1956) étudiant la production d'acide oxalique par le mycelium d'*Aspergillus niger*, prouvent qu'il provient en grande partie de la coupure oxydative de l'acide oxalacétique. Il se peut que l'acide tartrique soit un produit intermédiaire de cette réaction, car dans les mêmes conditions, il est lui aussi transformé en acide oxalique.

L'acide tartrique isolé des cultures bactériennes est toujours l'acide droit, le gauche n'a jamais été signalé.

2° Par les levures.

La production d'acide tartrique par les levures a été décrite une seule fois, sans avoir reçu une démonstration certaine. Martin et Foster (1955) ont trouvé que l'acide trans-époxysuccinique peut être utilisé comme seule source de carbone par divers microorganismes, et en particulier, par une levure. Le fait qu'avec l'un de ces microorganismes ces auteurs soient arrivés à montrer que l'acide mésotartrique est le produit de l'hydratation enzymatique de ce substrat, peut laisser supposer qu'il en est de même pour la levure.

3° Par les bactéries.

Alors que les moisissures ne produisent que de petites quantités d'acide tartrique, les bactéries peuvent en accumuler beaucoup plus. Ceci a donné à quelques chercheurs l'idée d'étudier une production microbiologique de cet acide. C'est surtout dans les pays anglo-saxons, qui en sont grands utilisateurs, que les recherches ont été le plus poussées. Deux brevets ont été pris, mais il ne semble pas qu'ils soient exploités.

Dans le procédé décrit volontairement d'une façon très vague par Kamlet (1943), l'acide tartrique serait produit simplement en faisant fermenter des solutions aqueuses de glucose par *Acetobacter suboxydans*.

Cette fermentation conduit généralement à la production d'acide gluconique ou de cétogluconique et l'inventeur n'indique pas quelle est la particularité qui permet d'obtenir l'acide tartrique. Il est vraisemblable qu'il s'agit d'une oxydation de gluconate catalysée par l'oxyde de vanadium.

Jackson, Koepsell, Lockwood, Nelson et Stodola (1949) ont affirmé que les acides tartrique et oxalique peuvent être obtenus par plusieurs souches d'*Acetobacter* qui poussent l'oxydation du glucose au-delà du 5-cétogluconate. On le trouve aussi accompagné d'acides glycolique et formique comme produit de l'oxydation du 5-cétogluconate par *Pseudomonas fluorescens*. Il ne se forme pas lorsque c'est le 2-cétogluconate qui est oxydé.

A la suite de ces études, Lockwood et Nelson (1951) prennent un brevet couvrant la production d'acide (+) tartrique par oxydation de 5-cétogluconate de potassium. Le microorganisme utilisé est *Pseudomonas fluorescens*. Le rendement est 24 p. 100 de l'acide tartrique que l'on pourrait théoriquement obtenir.

E. coli adapté à l'utilisation de l'acide acétique peut synthétiser un peu d'acide tartrique. La démonstration a été faite par Glasky et Rafelson (1957) avec de l'acétate radioactif. L'activité se trouve d'abord dans les acides glutamique et succinique et au bout de quelque temps, on en retrouve une partie dans l'acide tartrique. Il semble donc que cette voie de formation de l'acide

tartrique soit assez proche de celle que nous avons signalée pour les moisissures, à partir de l'éthanol.

B — Dégradation de l'acide tartrique

La dégradation microbienne de l'acide tartrique est connue depuis longtemps. Ce phénomène présente un intérêt pratique assez important, puisque c'est une cause de pertes appréciables dans la fabrication de l'acide tartrique à partir des tartres. Lorsque cette industrie s'est implantée aux Etats-Unis, au cours de la seconde guerre mondiale, on s'est aperçu que le principal obstacle à vaincre était la décomposition de l'acide tartrique par les microorganismes. Des études faites à cette occasion par VAUGHN et ses collaborateurs ont considérablement accru nos connaissances sur ce sujet.

Les expériences rapportées ne permettent pas toujours de séparer deux phénomènes différents. D'abord la possibilité, pour les microorganismes d'utiliser les tartrates comme seul aliment carboné ; cet aspect de la question, très intéressant du point de vue systématique, a été bien étudié pour les levures où le caractère a pu être proposé comme test de détermination. D'autre part, il est vraisemblable que des organismes qui ne seraient pas susceptibles de se multiplier à partir d'acide tartrique comme seul aliment carboné, peuvent le dégrader, lorsque le milieu contient en outre un substrat pouvant supporter la croissance du germe envisagé. Les recherches ont alors porté sur les produits de cette dégradation et les mécanismes qu'elle met en jeu.

1° Par les moisissures.

Les premiers travaux sur ce sujet sont dus à PASTEUR (1860). Le *Penicillium glaucum* peut pousser sur un milieu contenant de l'acide tartrique comme seule source de carbone et si on le met en présence de racémate, il consomme l'isomère (+) et laisse le (—) inchangé. C'est là une expérience fondamentale d'une portée très générale, qui allait, pendant longtemps, permettre de distinguer des isomères optiques naturels et non naturels, les premiers étant seuls susceptibles d'être fermentés.

Les travaux de PFEFFER (1895) faits avec des cultures pures de divers microorganismes devaient montrer que la règle de PASTEUR n'est pas absolue. *A. niger* van Thieghem, *A. fluorescens* Wied, *P. glaucum* Link, détruisent 75 à 100 p. 100 de l'acide tartrique (+) et 10 à 50 p. 100 du (—) lorsqu'ils sont ensemencés sur du racémate, pendant 4 à 20 semaines. *A. fumigatus* Fresenius, *Mortierella reticulata* van Thieghem et Le Monnier décomposent 10 à 15 p. 100 de chacun des isomères. Ces résultats sont confirmés par GORSKI (1937 et 1947) qui trouve que 21 espèces de moisissures peuvent se développer sur le tartrate (+) alors que 11 seulement poussent sur le (—). L'observation de PASTEUR garde cependant sa valeur, puisque toutes les souches étudiées marquent une préférence pour le tartrate (+), lorsqu'elles sont cultivées en présence de racémate. Des souches incapables de croître sur l'isomère (—) l'oxydent cependant à un certain degré lorsque la croissance se fait sur racémate. *A. niger* montre des différences morphologiques suivant l'isomère utilisé : c'est ainsi qu'il ne produit pas de conidiophores dans l'isomère (—).

Habituellement, l'acide tartrique est dégradé par les moisissures en CO_2 et H_2O sans qu'aucun produit du métabolisme ne s'accumule dans le milieu. Deux espèces font exception, *A. niger* et *A. schiemanii* en produisant de l'acide oxalique.

D'après Pfeffer (1895), *Botrytis bassiana* Bals n'attaque pas le tartrate. *Penicillium puberulum* utilise l'acide tartrique dans le milieu de Raulin d'après les résultats d'Alsberg et Black (1913). Bedford (1936) signale qu'une souche de *Penicillium* pouvant tolérer une solution saturée de sulfate de cuivre peut utiliser le tartrate comme seule source de carbone. Herzog et Meier (1909) constatent que des préparations séchées de *Penicillium* sont capables d'oxyder l'acide (+) tartrique, plus vite que le (—) tartrique.

Pellicularia koleroga, parasite du caféier, agit de même selon Mathew (1954).

Boeseken et Waterman (1912) décrivent une souche de *P. glaucum* qui peut attaquer les trois isomères de l'acide tartrique.

Takahashi, Sakaguchi et Asai (1926) ont étudié des souches de *Rhizopus* capables d'attaquer l'acide tartrique. Parmi les produits de dégradation, ils ont mis en évidence l'acide fumarique et l'éthanol.

La Rivière (1958) a trouvé que les espèces suivantes peuvent utiliser pour leur croissance au moins un des isomères de l'acide tartrique. Ce sont *Aspergillus flavus, A. niger. A. fumigatus, A. oryzae, Penicillium expansum, P. libacinum, P. brevicaule.* Aucune de ces souches n'utilise de préférence le tartrate (—). En vue de rechercher si de telles espèces existent dans la nature, cet auteur a fait des cultures d'enrichissement à partir de terre sur un milieu ne contenant que l'isomère (—). Il a ainsi isolé deux souches qui sont susceptibles de pousser sur le tartrate (—) et méso et pas sur le (+). Cette propriété ne s'est pas maintenue en culture, ce qui serait attribuable à des mutations.

Stadtman, Vaughn et Marsh (1945) isolent à partir d'échantillons de tartre attaqués par des moisissures, les espèces suivantes : *Alternaria* sp., *Aspergillus niger, A. fumigatus, Fusarium roseum, Penicillium digitatum* 5 souches, *Rhizopus nigricans.* Ils ont testé le comportement de ces souches et d'autres provenant de collections, sur des milieux contenant de l'acide (+) tartrique à divers pH. Les résultats du tableau II ont été obtenus. Les cultures d'*A. niger* sur un milieu contenant tartrate et tryptone, montrent que pendant les 5 premiers jours où se développe le mycelium, l'acide tartrique ne disparaît pas, mais ensuite la décomposition est importante et peut atteindre 90 p. 100 après 15 jours. Il est surprenant de constater que *A. niger* et *P. digitatum* peuvent attaquer le tartrate de calcium dès que son humidité dépasse 10 p. 100.

Müller-Thurgau (1888) a constaté la disparition d'une partie de l'acide tartrique dans les raisins atteints de pourriture noble. Cette transformation est due à *Botrytis cinerea* qui est la forme conidienne de *Sclerotinia fuckeliana.* L'étude reprise par Charpentie (1954), en ce qui concerne les raisins de Sauterne indique que la concentration en acide tartrique est six fois plus forte dans les baies saines que dans celles attaquées par cette moisissure. L'acide malique est moins rapidement consommé puisqu'il ne diminue que de moitié. Les cultures pures de *B. cinerae* cultivées en surface sur des jus de raisin se comportent différemment puisqu'elles consomment avec la même vitesse l'acide tartrique et l'acide malique. La disparition des acides, qui est de 15 p. 100 à pH 7, atteint 90 p. 100 à pH 4,6.

Gerber (1896) constate que *Sterigmatocystis nigra* consomme plus facilement l'acide (+) tartrique que le glucose lorsqu'on le maintient à 37°C. Le métabolisme de l'acide tatrique diminue plus rapidement que celui du glucose lorsque la température diminue. Il diffère en cela de celui de l'acide malique, puisque ce dernier est toujours consommé plus rapidement que le glucose, quelle que soit la température.

2° Par les levures.

LAURENT (1890) a indiqué que les tartrates peuvent être utilisés comme aliments par les levures. L'isomère (+) est mieux assimilé que le (—). Le paratartrate de Na et NH_4 ne peut servir à la croissance. Les tartrates ne peuvent être utilisés par la levure que lorsqu'elle est en aérobiose. KARKZAG (1912 *a*) a trouvé que des suspensions non proliférantes de levures peuvent décarboxyler les isomères de l'acide tartrique. Les deux souches étudiées sont peu différentes à cet égard. Les isomères méso et (+) sont transformés à peu près à la même vitesse, le racémique deux fois moins vite et le (—) presque pas. KARCZAG (1912 *b*) a mis en évidence deux produits de ce métabolisme : les acides lactique et succinique.

Les cellules non proliférantes de *Mycoderma vini* Desmazières = *Candida mycoderma* Reess n'ont pu oxyder l'acide tartrique (+) dans les expériences de CHAUVET (1942). Cependant DUPUY (1952) met en évidence la disparition de l'acide tartrique (+) dans des cultures de *Mycoderma* isolées de vins. Ce microorganisme oxyde l'acide tartrique en même temps que l'éthanol sans qu'il ait été possible de mettre en évidence l'accumulation de produits intermédiaires.

Les 13 souches de *C. mycoderma* isolées de la bière par WALKER et WILES (1952) ne peuvent assimiler l'acide tartrique lorsqu'il est seul aliment carboné.

L'étude de l'assimilation de l'acide tartrique (+) par 355 souches de levures a été faite d'une façon systématique par ZAAKE (1958). Seules les souches appartenant aux genres *Rhodotorula, Cryptococcus* et *Trichosporon* peuvent l'assimiler. C'est un caractère que l'on retrouve dans toutes les souches du genre *Cryptococcus*. Il peut donc être utilisé dans la classification et il est préférable de réaliser ce test suivant la technique de Wickerham. Les souches qui attaquent le plus fortement l'acide tartrique appartiennent au genre *Trichosporon*. Le système enzymatique responsable de la dégradation de l'acide tartrique ne semble pas être de nature adaptative comme celui des bactéries. C'est ainsi que la croissance sur milieu liquide ne nécessite pas de période d'adaptation préalable.

KUDRIAVZEW (1954) a utilisé le caractère d'assimilation de l'acide tartrique (+) dans sa classification des levures. Des tests positifs ont été obtenus avec *Pichia alcoholophila* (= *Pichia membranaefaciens*), *Zygowillia chodati, Williopsis saturnus* (= *Hansenula saturnus*), *Zygowilliopsis californicus, Debaryomyces kursanovi* et *Debaryomyces mucosus* (= *Torulopsis candida*).

LA RIVIÈRE (1958) a confirmé l'assimilation de l'acide tartrique (+) par les espèces déjà signalées par KUDRIAVZEW (1954), excepté pour *Zygowillia chodati* et *Debaryomyces mucosus*. Il a pu aussi isoler des levures à partir de cultures d'enrichissement sur racémate. Toutes les souches sont fortement aérobies et forment un voile à la surface du liquide. Elles ont été identifiées à *Cryptococcus laurentii, Candida muscorum, Trichosporon pullulans* et *Rhodotorula glutinis*.

3° Par les bactéries.

Sur ce point particulier, la bibliographie est très abondante et elle s'étend sur tout un siècle. Plutôt que de suivre strictement l'exposé chronologique des faits, nous avons préféré les grouper dans les quatre rubriques suivantes : premières recherches, test d'assimilation des tartrates dans la systématique bactérienne, bactéries isolées des vins, recherches récentes.

Premières recherches.

PASTEUR (1876) découvre que des bactéries morphologiquement semblables aux ferments lactiques, et susceptibles de produire un dégagement gazeux, peuvent se développer à partir du tartrate (+) sans utiliser le (—). Le même comportement se retrouve chez les vibrions « pouvant vivre sans oxygène libre et en dehors de tout contact avec l'air de l'atmosphère ».

TABLEAU II

Bactéries dégradant l'acide tartrique.

Nom de l'espèce	
Pseudomonas	Maassen (1896)
Escherichia	Maassen (1896)
Bacillus tartricus = *Aerobacter cloacae*	Grimbert et Ficquet (1897) d'après Vaughn, Marsh, Stadtman, Cantino (1946)
Aerobacter tartarivorum = *Aerobacter aerogenes*	Nijdam (1907) d'après Vaughn, Marsh, Stadtman, Cantino (1946)
Pseudomonas *Micrococcus*	Beijerinck et Minckman (1910)
Mycobacterium phlei *Mycobacterium luteum* *Mycobacterium rubrum*	Söhngen (1913)
Acetobacter rancens *Acetobacter suboxydans*	Wisser't Hooft (1925)
Bacterium typhosus = *Salmonella typhosa* *Bacterium paratyphosus* = *Salmonella paratyphi*	Brown, Duncan, Henry (1925)
Pseudomonas 27 souches sur 58 *Bacterium* 3 souches sur 42 *Bacillus* 1 souche sur 16	de Jong (1926)
Propionobacterium	Van Niel (1928)
Desulfovibrio desulfuricans	Baars (1930)
Bactérie productrice de méthane	Symons et Buswell (1933)
Aerobacter aerogenes	Barker (1936)
Acetobacter rancens *Acetobacter subo ydans*	Bernhauer (1938)
Bacterium succinicum = *Escherichia*	Sakaguchi et Tada (1940)
Veillonella gazogenes	Johns (1951)
Hemophilus pertussis	Sadataro Abe (1952) oxydation par cellules non proliférantes en présence de bleu de méthylène.
Pseudomonas incognita	Nomura (1954)
Escherichia coli *Acetobacter rancens*	Jacobsohn et Azevedo (1955)
Mycobacterium avium	Kimura, Katayama, Sasakawa (1956)
Pseudomonas	Shilo et Stanier (1957)
Pseudomonas putida *P. fluorescens* *P. denitrofluorescens* sur 13 espèces essayées *Aerobacter aerogenes* 3 souches sur 7 essayées *Escherichia coli* *E. freundii* sur 5 espèces essayées	La Rivière (1958)

PFEFFER (1895) signale des bactéries qui peuvent attaquer le tartrate, au cours d'une étude portant sur les substances organiques susceptibles de servir d'aliments aux microorganismes.

MAASSEN (1896) a recherché des souches bactériennes capables de métaboliser le tartrate. Elles sont mises en évidence par l'alcalinisation de la culture qui s'est développée sur le tartrate de NH_4. Certaines souches des genres *Pseudomonas* et *Escherichia* satisfont à ces tests.

Cette propriété a été rapportée incidemment dans de nombreux mémoires, on en trouvera la liste dans le tableau II. La plupart de ces souches métabolisent le (+) tartrate, mais parfois d'autres isomères sont aussi utilisés.

Test d'assimilation des tartrates dans la systématique bactérienne.

BROWN, DUNCAN et HENRY (1925) ont souligné l'intérêt que peut avoir le test d'assimilation des tartrates dans la classification bactérienne. Ils proposent de l'exécuter selon deux techniques différentes. Par culture sur milieu liquide à pH 7,4 en présence de rouge de phénol et d'un tube de Durham, on peut noter l'acidification ou l'alcalinisation du milieu, ainsi que le dégagement gazeux qui se produit parfois. La disparition de l'acide tartrique peut aussi être constatée par précipitation à l'acétate de plomb. Le précipité est faible lorsque le milieu ne contient plus d'acide tartrique, il est au contraire très abondant si la bactérie ne le métabolise pas. Le test a permis aux auteurs de différencier *Salmonella typhosa* et *Salmonella paratyphi* types A, B et C.
Salmonella typhosa acidifie le milieu puis l'alcalinise sans dégagement de gaz.
Salmonella paratyphi A pas de changement, pas de gaz.
Salmonella paratypgi B alcalinise. pas de gaz.
Salmonella paratyphi C acidifie puis alcalinise, dégagement de gaz.

KAUFFMAN (1954) a pris en considération la propriété de métaboliser les 3 isomères de l'acide tartrique dans sa classification des *Enterobacteriaceae*. La plupart des *Salmonella* utilisent au moins un isomère alors que les *Shigella* et *Proteus* en général ne les métabolisent pas. Le caractère est plus inconstant chez *Escherichia* et *Klebsiella*.

L'aptitude à métaboliser les divers isomères de l'acide tartrique est une propriété qu'il est parfois difficile de mettre en évidence. Tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître qu'il s'agit d'un métabolisme adaptatif. C'est ainsi que JACOBSOHN et AZEVEDO (1955) ne sont parvenus à adapter une souche d'*E. coli* à l'assimilation du tartrate qu'après 11 repiquages.

Un milieu à base de tartrate a été proposé par JORDAN et HARMON (1928) pour la différenciation d'*Escherichia coli* et *Aerobacter aerogenes*. VAUGHN, MARSH, STADTMAN et CANTINO (1946) ont montré que ce milieu ne peut servir à différencier les deux genres, puisque des souches capables d'assimiler le tartrate se retrouvent dans l'un comme dans l'autre groupe.

Il ressort de tous ces travaux, que le métabolisme du tartrate n'est pas une propriété spécifique, du moins pour les espèces qui ont déjà été décrites sans tenir compte de cette aptitude. Elle permettrait plutôt de caractériser les souches à l'intérieur de l'espèce.

Bactéries isolées du vin.

L'acide tartrique du vin peut être dégradé par des bactéries, ce qui produit une altération à laquelle on réserve actuellement le nom de « tourne ». Ni BALARD (1861) ni PASTEUR (1873) ne paraissent avoir remarqué la dimi-

nution de l'acide tartrique dans les vins malades qu'ils ont examinés. Il semble que le mérite de cette découverte doive être attribué à GLENARD (1862).

Les modifications chimiques que la bactérie de la tourne provoque dans le vin sont décrites avec précision par GAUTIER (1878). Cet auteur reconnaît la présence d'une quantité anormalement élevée d'acide acétique et de l'acide lactique. Il extrait aussi de ces vins un acide qu'il identifie à l'acide tartronique. Cet acide n'ayant jamais été retrouvé dans les produits de dégradation de l'acide tartrique, cette affirmation ne peut être retenue ; il s'agit vraisemblablement d'acide succinique.

L'isolement des microorganismes responsables de cette dégradation a été tenté par KRAMER (1892) puis par BORDAS, JOULIN et RACKOWSKI (1898). L'utilisation d'un milieu non sélectif les a conduits à un bacille sporulé, contamination banale du vin, qui n'a sûrement rien à voir avec l'altération décrite. L'aptitude de ce *Bacillus roseus vini* à dégrader l'acide tartrique n'est d'ailleurs pas démontrée par les expériences rapportées. MAZE et PACOTTET (1904) ont utilisé dans leurs isolements une meilleure technique, puisqu'ils sont partis de vins vieux, altérés, conservés suffisamment longtemps en bouteille, pour que les spores de moisissures et de bactéries banales ne soient plus vivantes. La descripition de la souche correspond bien à celle que nous connaissons aujourd'hui. Il n'a cependant pas été possible de reproduire la maladie dans un vin sain avec ces bactéries. A présent que nous connaissons mieux les difficultés de croissance de ces microorganismes, cet échec ne nous étonne pas. A la même époque, LABORDE (1904) isole une bactérie de vins tournés et parvient à reproduire la maladie. Les importantes études menées par MÜLLER-THURGAU et OSTERWALDER (1919) nous ont appris qu'il existe dans le vin plusieurs espèces de ferments lactiques capables de transformer l'acide malique en acide lactique et de donner une fermentation hétérolactique à partir de divers sucres. Une seule espèce, dénommée *Bacterium tartarophtorum*, possède en outre la propriété de dégrader l'acide tartrique. Trois souches provenant de ces isolements ont été étudiées à nouveau par OSTERWALDER (1952) ; le caractère d'attaque de l'acide tartrique s'est conservé et on a reconnu parmi les produits de leur métabolisme, l'acide lactique et l'acide acétique.

RIBEREAU-GAYON (1947) isole des vins plusieurs bactéries et les sépare en deux groupes, suivant qu'elles attaquent ou non l'acide tartrique. Il constate encore que toutes les souches attaquent l'acide malique et quelques-unes attaquent en outre l'acide tartrique. Ce dernier caractère est stable et se retrouve dans les milieux de culture artificiels comme dans le vin. Le pH à partir duquel l'acide tartrique peut être dégradé est voisin de 3,5 alors que l'acide malique est encore transformé à un pH voisin de 3.

ARENA (1936) isole des vins Argentins une bactérie qu'il dénomme *Bacterium acidovorax*. Elle attaque l'acide tartrique et diffère de *Bacterium tartarophtorum* par sa propriété d'attaquer aussi le mannitol, ce qui fait que l'accumulation de ce produit ne peut être mis en évidence dans le vin.

Il est étonnant que la propriété d'attaquer l'acide tartrique, remarquablement constante pour toute une série de souches isolées des vins, n'ait pas poussé les auteurs qui se sont occupés de la taxonomie des bactéries lactiques à reconnaître cette espèce comme distincte des autres *Lactobacillus*. La classification de Bergey, 7e édition, reconnaît cependant *Clostridium tartarivorum* comme espèce distincte de *Clostridium thermosaccharolyticum*, bien qu'elles ne diffèrent entre elles que par la possibilité d'attaquer le tartrate.

Travaux récents.

Les travaux bactériologiques récents ont été provoqués par l'étude de la décomposition des tartres dans les usines de récupération. VAUGHN et MARSH (1943) signalent que les *Lactobacillus* sont capables de dégrader l'acide tartrique. Mais à cause de leur développement lent, ce ne sont pas eux qui sont responsables des accidents signalés dans les usines de récupération. Les espèces les plus actives dans ce processus appartiennent au genre *Aerobacillus* et *Aerobacter*; elles sont thermophiles et se développent encore à 74°C. La croissance se fait dans une zone de pH allant de 4,7 à 8. Il est à remarquer que ces bactéries préfèrent le malate comme substrat et n'attaquent le tartrate que lorsque tout le malate à été consommé. VAUGHN, MARSH, STADTMAN et CANTINO (1946) isolent, à partir d'échantillons de tartres bruts, 26 souches appartenant à la famille des *Enterobacteriacee*. Toutes les souches isolées attaquent l'acide tartrique et aussi le glycérol. Elles appartiennent aux espèces suivantes : *A. aerogenes* (10 souches), *E. coli* (5 souches), *E. neapolitana* (2 souches), *E. communior, E. acidi lactici, E. freundii, E. intermedium.*

Lorsqu'on recherche l'aptitude à décomposer le tartrate dans les souches entretenues en collection, on s'aperçoit qu'il n'existe pas de relation avec l'espèce. Les trois isomères sont généralement attaqués, mais avec des vitesses différentes. C'est le (+) qui disparaît le premier.

En employant une technique de culture anaérobie, TABACHINICK et VAUGHN (1948) ont obtenu à partir d'échantillons de tartres, 23 souches qui, à deux exceptions près, se classent comme *Clostridium butyricum*. Les bactéries décomposent l'acide tartrique en acide acétique, acide butyrique, CO_2 et H_2. Il se forme aussi un peu d'alcool éthylique et d'acide pyruvique. Cette propriété ne se retrouve pas dans les souches de *Clostridium butyricum* ayant une autre origine. Bien que ce métabolisme particulier soit dû à une enzyme adaptative, il n'a pas été possible d'adapter des souches de ce microorganisme prises dans les collections. Ici aussi, toutes les souches qui attaquent l'acide tartrique attaquent l'acide malique.

De nouveaux isolements d'anaérobies ont été faits par MERCER et VAUGHN (1951). Les 13 souches décrites sont anaérobies, sporulées, non protéolytiques et thermophiles. La température minimum de développement est 30 ou 37°C selon les souches et le maximum est 67°. A pH 4,6 et au-dessous, aucune souche n'attaque l'acide tartrique. Les produits de la fermentation anaérobie sont CO_2, H_2, acide acétique et un peu d'acide butyrique. Les souches diffèrent de *Cl. thermosaccharolyticum* par leur aptitude à métaboliser le tartrate, elles ont reçu le nom de *Cl. tartarivorum*, qui a été accepté comme espèce distincte dans « Bergey's manual of determinative bacteriology » (1957).

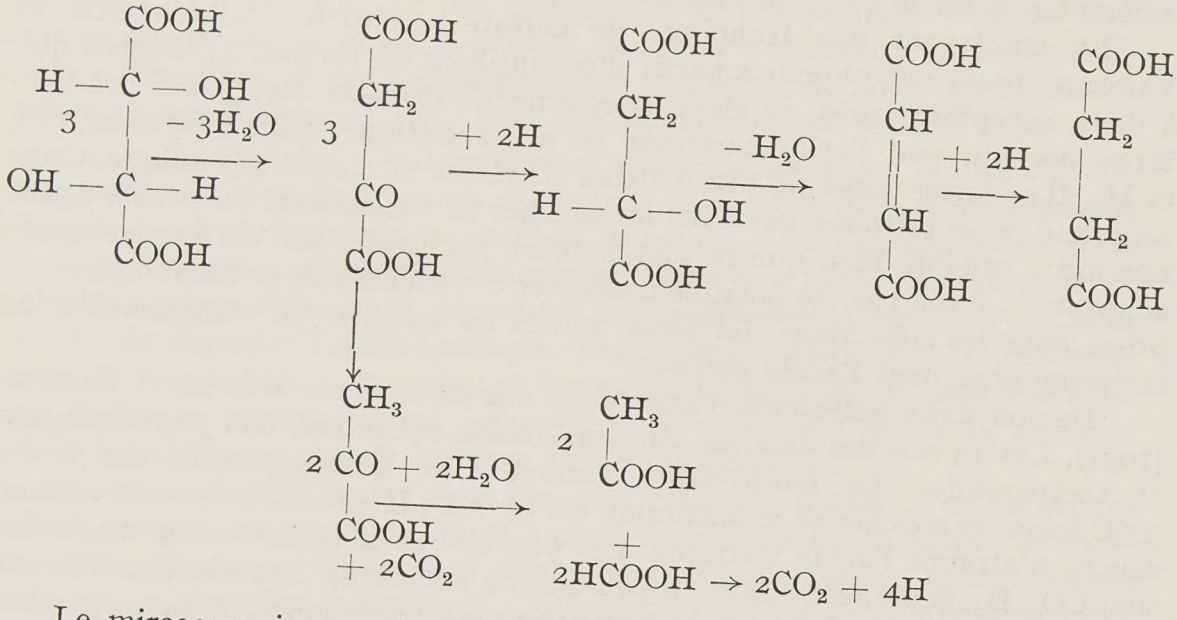
La recherche de souches susceptibles d'attaquer l'acide tartrique a été faite dans le sol par SHILO et STANIER (1957) et par LA RIVIÈRE (1958). Ces travaux tendaient à trouver des souches spécifiques pour chacun des isomères. SHILO et STANIER (1957) ont isolé plusieurs souches appartenant au genre *Pseudomonas*. Ils ont montré que la propriété de métaboliser un isomère de l'acide tartrique est conditionnée par deux systèmes inductibles, l'un indispensable pour permettre au substrat de pénétrer dans la cellule et l'autre responsable de la transformation en acide oxalacétique.

LA RIVIÈRE (1958) a obtenu par les techniques aérobies d'isolement sur milieu au tartrate 67 souches de *Pseudomonas*. Par les techniques anaérobies, il a eu 35 souches d'*Escherichia* et 2 d'*Aerobacter*. Ce résultat confirme donc qu'il est impossible de différencier les deux genres en utilisant un milieu d'iso-

lement au tartrate. A partir d'échantillons chauffés, il a isolé 3 bactéries sporulées dont l'une a été identifiée à *Bacillus megaterium*.

Pseudomonas putida est capable d'oxyder entièrement le tartrate en gaz carbonique et en eau. En anaérobiose, aucune transformation ne se produit. La première réaction de ce métabolisme est la déshydratation du tartrate avec production d'acide oxalacétique. Shilo et Stanier (1957) ont montré que ce n'était pas là la seule voie de métabolisme que pouvaient employer les *Pseudomonas*. Sur 15 souches étudiées, 8 passent par la voie de l'oxalacétate et 2 par celle du glyoxylate. Il semble cependant que la voie par l'oxalacétate soit la plus courante, elle a été mise en évidence par Krampitz et Lynen (1956) chez une bactérie Gram + qui n'a pas été davantage caractérisée ; et aussi par Nomura et Sakaguchi (1955) chez *Pseudomonas incognita*. Comme nous l'avons déjà indiqué, la transformation par voie chimique de l'acide (+) tartrique en acide oxalacétique avait été obtenue par Wohl et Osterling dès 1901.

L'acide oxalacétique n'est qu'un intermédiaire dans la dégradation de l'acide tartrique. Avec *Pseudomonas incognita* étudié par Nomura (1954) puis par Nomura et Sakaguchi (1955), le schéma de la fermentation qui conduit à la production d'acides succinique et acétique est vraisemblablement le suivant :



Le mircoorganisme qui a servi aux expériences de Krampitz et Lynen (1956) donne les produits de fermentation suivants :

(+) tartrate ⟶ 0,19 lactate + 0,85 acétate + 1,73 CO_2 + 0,45 H_2

Chapitre III

MÉTABOLISME DE L'ACIDE TARTRIQUE PAR LES VÉGÉTAUX

On a vu qu'il existait quelques cas isolés de synthèse de l'acide tartrique par les microorganismes. Cependant, c'est le règne végétal qui fournit à l'homme la totalité de l'acide tartrique qu'il consomme.

1° Les plantes à acide tartrique.

Une revue consacrée aux acides organiques des plantes par THIMANN et BONNER (1950) fait le point de cette question. Ces auteurs pensent que l'acide tartrique n'est pas un de ces produits largement répandus tels que l'acide malique ou succinique. On le trouve au contraire dans un nombre de plantes assez restreint, mais dans certaines, il peut atteindre des concentrations importantes. La même observation peut être faite pour l'acide oxalique, ce qui laisse supposer que ces deux acides présentent quelque parenté sur le plan biologique.

L'identification de l'acide tartrique dans les végétaux était autrefois une opération assez difficile. Bien souvent les auteurs se sont contentés d'obtenir des cristaux ayant même forme que ceux du bitartrate de potassium ou du tartrate de calcium pour conclure à sa présence. Il n'est pas étonnant que des techniques aussi sommaires aient conduit à de très nombreuses erreurs.

FRANZEN et HELWERT (1932) ont trouvé des indications bibliographiques indiquant la présence d'acide tartrique dans 82 plantes différentes. Ils pensent que dans 5 cas seulement, la présence peut être reconnue comme certaine.

Depuis l'apparition de la chromatographie et spécialement de la chromatographie sur papier, on dispose d'une méthode d'identification plus rapide et plus sûre qui a amené récemment sa mise en évidence dans de nouvelles espèces.

D'après THIMANN et BONNER (1950), VICKERY et PALMER (1954), la présence d'acide tartrique a été démontrée dans les espèces suivantes :

Vitis vinifera
Tamarindus indica
Acer saccharinum
Beta vulgaris
Dialium indum
Sandoricum koetjape
Ecdysanthera rosea
Schizandra chinensis
Ananas sativus

D'après STAFFORD (1959), il n'y aurait pas d'acide tartrique dans les feuilles de betterave. Sa présence dans la racine, puis dans la racine et dans les feuilles a cependant été confirmée par VAVRUCH (1954) et GOLOVIN, ROMINSKII et SUSHKOVA (1955). Ces derniers auteurs ont aussi signalé sa présence dans les tubercules de topinambour (*Heliantus tuberosus*). FUJII et UKITA (1955) le signalent dans les conserves de pousses de bambou. CHIAO-MU HSU (1951) indique sa présence dans une plante de la pharmacopée chinoise : *Chenopodium ambrosioides* ; ensuite WATANABE et TAKANO (1953) le rencontrent dans *Digena simplex*. Sa présence dans la tomate : *Lycopersicon esculentum* est signalé par AIRAN et BARNABAS (1953) qui indiquent qu'il est plus abondant dans la variété à petits fruits. TAKEMOTO et KOIKE (1953) l'ont rencontré dans les jeunes tiges de *Polygonum reynoutria*. Dans le sirop de sorgho, il peut exister en proportion importante d'après WILLAMAN, WEST, SPRIESTERBACH (1919) et MADER et WEBSTER (1954) ; on enregistre d'ailleurs de grandes différences suivant les variétés étudiées. Selon BHARUCHA et JOSHI (1954), l'acide tartrique existe dans les jeunes tiges et les jeunes feuilles de *Ricinus communis*. Mais on doit dire qu'il n'a pas été trouvé par DESVEAUX et KO-

GANE (1954) dans les acides organiques formés au cours de la germination des graines de ricin. Il a été signalé dans le genre *Pelargonium* par RANJAN et ROJA RAO (1955) puis dosé par GYR (1956). STAFFORD (1959) a trouvé des quantités importantes d'acide tartrique dans *Parthenocissus tricuspidata, P. quinquifoglia, Pelargonium hortatum, Coleus, Phaseolus.* Il semble donc que la liste des plantes à acide tartrique qui avait été ramenée de 82 à 5 par FRANKEN et HELWERT (1932) soit en train de s'allonger rapidement par suite de l'emploi de nouvelles méthodes de détection.

On est certain que c'est l'isomère droit qui est présent dans la baie de *Vitis vinifera* et dans *Tamarindus indica,* aucune indication n'est donnée sur la nature des acides tartriques trouvés dans les autres végétaux. A notre connaissance, le mésotartrate n'a jamais été rencontré dans la matière vivante. L'isomère (—) a été signalé par RABATE et GOUREVITCH (1941) puis PEYNAUD (1951) dans les feuilles de *Bauhinia reticulata.* Il y existe en grande quantité puisqu'il a été possible d'extraire 45 g de tartrate acide de potassium par kg de feuilles traitées. Il semble que ce soit le seul cas connu où l'isomère (—) soit présent d'une façon certaine.

La présence d'acide (—) dans les produits de la vigne est beaucoup moins certaine. Lorsqu'on se reporte aux célèbres travaux de PASTEUR (1853) sur ce sujet, on apprend que l'acide racémique se produit dans les fabriques de tartre en porportion variable, habituellement faible. Dans certains cas, il peut faire défaut. A la suite d'une enquête, cet auteur a pu conclure que l'apparition d'acide tartrique racémique dépend de l'origine du tartre qui approvisionne les fabriques. Il est présent dans les tartres de Toscane, d'Autriche, de Hongrie et de Saintonge. Il fait défaut dans ceux de Bourgogne et d'Alsace. PASTEUR (1849) avait déjà montré que l'acide racémique était le mélange, en quantités égales, des isomères (+) et (—). Le fait de pouvoir extraire du racémate de certains produits de la vigne, laisse donc supposer que l'isomère (—) est aussi produit par cette plante, du moins pour certaines variétés et dans certaines conditions. La présence d'acide (—) tartrique pourrait aussi être due à l'existence d'une racémase produite par la flore microbienne qui se développe dans les bacs de cristallisation. Cette explication est peu vraisemblable car, jusqu'ici, cette racémase n'a jamais été trouvée : MARTIN et FOSTER (1955). Malgré ces résultats, tous les auteurs affirment d'une façon unanime que le raisin ne renferme que l'isomère droit de l'acide tartrique, voir par exemple : RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (1958).

Quant à l'acide tartrique présent dans la feuille de vigne, on peut présumer que c'est l'isomère (+), mais d'après STAFFORD et LOEWUS (1958), ce point mérite d'être examiné avec plus de soin.

La répartition de l'acide tartrique dans les diverses parties du plant de vigne a été étudiée par G. RIBEREAU-GAYON (1959). Il atteint dans les organes verts, feuilles et rameaux de l'année, une concentration pouvant s'élever à 3,7 p. 100 de la matière sèche. Dans les autres parties de la plante, y compris les racines, sa concentration est faible et ne dépasse pas 0,37 p. 100.

2° Evolution de l'acide tartrique dans les végétaux.

L'acide tartrique n'est présent que dans un nombre assez limité de végétaux. Dans certains d'entre eux, il peut atteindre des concentrations très importantes. C'est ainsi que le fruit de *Tamarindus indica* peut contenir, d'après THIMANN et BONNER (1950) jusqu'à 10,8 p. 100 du poids sec en acide libre et

6,4 p. 100 en sel de potassium. Dans le jus de raisin, sa concentration peut atteindre près de 10 g/l. Quel est donc le rôle d'un corps qui se trouve en aussi grande quantité? Il n'est pas encore possible de répondre à cette question. Nous savons cependant que les acides organiques peuvent, d'une façon générale, être utilisés dans trois processus principaux : les transaminations, l'assimilation et la respiration.

Transamination.

Dans le cas de l'acide tartrique, la transamination devrait conduire à l'acide hydroxyaspartique

$$\begin{array}{l} COOH - CHOH - CH - COOH \\ \qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\quad NH_2 \end{array}$$

de même que la transamination de l'acide malique conduit à l'acide aspartique. D'après Bidan et Andre (1959), cet acide n'a pas été trouvé dans les produits du raisin et sa présence dans les protéines n'est pas certaine.

Il est donc vraisemblable que le processus de transamination de l'acide tartrique doit être de peu d'importance dans le cas particulier de la vigne.

La réaction de transamination est cependant possible avec l'acide dihydroxyfumarique qui est le produit de l'oxydation catalytique de l'acide tartrique. En effet, selon Sallach et Peterson (1956), la réaction

$$\begin{array}{c} \text{acide dihydroxyfumarique} + \text{acide glutamique} \rightleftarrows \text{acide } \beta \text{ (D)} \\ \text{hydroxyaspartique} + \text{acide } \alpha \text{ cétoglutarique} \end{array}$$

est catalysée par une enzyme extraite du cerveau de mouton, dont les cofacteurs sont le Mg^{++} et le phosphate de pyridoxal.

Kun et Hernandez (1956) suggèrent que les acides β hydroxyaspartique et diamino succinique peuvent servir de régulateurs physiologiques du métabolisme. Il semble en effet que ces deux acides aminés assez rares soient des antimétabolites. Pour le β hydroxyaspartate qui est de série (D), la chose paraît sûre depuis que Shive et Macow (1946) ont montré qu'il inhibe la croissance de *E. coli* et *L. mesenteroides*.

Assimilation.

Aucun argument ne permet de penser que l'acide tartrique peut avoir un rôle dans l'assimilation chlorophyllienne. Cette hypothèse avait cependant été avancée par Petit (1869). Les acides organiques, dans le cas de la vigne et des végétaux en général, pouvaient, d'après cet auteur, être regardés comme les précurseurs des sucres. Cette idée lui avait été suggérée par le fait que l'acidité varie peu dans la feuille de vigne, alors que les sucres s'accumulent dans le fruit. Les connaissances acquises récemment sur le mécanisme de la photosynthèse enlèvent toute vraisemblance à cette théorie.

G. Ribereau-Gayon (1959 *b*) a proposé l'acide malique comme le précurseur de l'acide tartrique dans la vigne. D'après cet auteur, l'acide malique élaboré dans les racines serait amené dans la feuille où interviendrait sa transformation en acide tartrique et cela d'une façon plus ou moins importante suivant le cépage.

Ces théories ne résistent pas aux résultats des expériences de Stafford et Loewus (1958) qui ont étudié la fixation de $C^{14}O_2$ dans la feuille de vigne. La radioactivité se retrouve après photosynthèse principalement dans les

acides malique et citrique. Dans le tartrique, elle n'atteint au maximum que 1/1 000° de ce que l'on trouve dans le malique. C'est la preuve d'une synthèse peu active de ce composé. L'acide tartrique n'apparaît marqué que quelque temps après une période de photosynthèse alors que le malate peut devenir radioactif même à l'obscurité. On doit donc considérer l'acide tartrique comme un produit indirect de la photosynthèse, et en cela il diffère beaucoup de l'acide malique. Lorsque l'on recherche la répartition de la radioactivité sur les divers atomes de carbone, les différences entre ces deux acides deviennent encore plus importantes. Dans l'acide malique, 85 p. 100 de la radioactivité se trouve sur les carbones 1 et 4, alors que dans l'acide tartrique, on n'en mesure que 25 p. 100.

Cette expérience exclut donc la possibilité de faire passer la synthèse de l'acide tartrique par l'acide malique. La répartition de la radioactivité suggère plutôt que les atomes de carbone 2 et 3 de l'acide tartrique pourraient provenir des atomes de carbone 3 et 4 du glucose. Voici en effet les résultats trouvés par Loewus et Stafford (1958) dans le cas d'une feuille de vigne excisée alimentée avec de l'acide ascorbique radioactif sur le carbone 6.

Atomes du glucose	*Radioactivité en p.* 100 du total	*Radioactivité en p.* 100 après élimination des atomes 1 et 6	*Radioactivité de l'acide tartrique.*
1	21,5		
2	6	11,4	12,5
3	23,0	44	37,5
4	21,0	40,2	37,5
5	2,5	4,2	12,5
6	26		

Des conclusions à peu près analogues peuvent être déduites des expériences réalisées par Gyr (1959) sur *Pelargonium*. Alors que l'acide malique est immédiatement marqué à partir du CO^2 de l'atmosphère, l'acide tartrique ne devient radioactif qu'après 4 heures. L'acide tartrique se comporte comme les autres acides du cycle tricarboxylique, sa formation est favorisée par une augmentation de la tension d'oxygène.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Nomura et Sakaguchi (1955) qui ont étudié la décomposition du tartrate par une bactérie en présence de carbonate radioactif. Ces auteurs ont mis en évidence une réaction de Wood et Werkman susceptible de rendre compte de la radioactivité qui s'incorpore dans le tartrate. L'équilibre suivant est le plus vraisemblable :

$$\text{Tartrate} \rightleftarrows \text{Oxalacétate} \rightarrow \text{Succinate}$$
$$\downarrow\uparrow$$
$$C^{14}O_2$$

et l'expérience indique bien que la radioactivité est présente uniquement sur les carbones du carboxyle.

Le fait que ce phénomène ait pu être mis en évidence lorsqu'il existe, confirme qu'il ne doit pas intervenir dans l'élaboration de l'acide tartrique par les plantes.

Hough et Jones (1956) font remarquer que des concentrations élevées en acide (+) tartrique sont généralement accompagnées de fortes teneurs en acides hexuronique et ascorbique. On peut donc envisager une relation dans le métabolisme de ces trois substances. Avec la feuille de vigne, Loewus et Stafford (1958) ont essayé de vérifier cette hypothèse. Les feuilles exci-

sées alimentées avec de l'acide ascorbique radioactif ne produisent que du tartrate très faiblement marqué, alors qu'une partie importante de la radioactivité se retrouve dans le saccharose et l'acide malique. L'acide ascorbique n'apparaît donc pas comme un précurseur direct du tartrique.

Des recherches déjà anciennes ont montré que le tartrate peut se former par oxydation de l'acide 5-cétogluconique BARCH (1932), ISBELL et HOLT (1945), ou de l'acide saccharique FISCHER et CROSSLEY (1894), BERGMANN (1922). Elles ont conduit GAKHOKIDZE (1949) à proposer une théorie qui fait dériver l'acide tartrique de la scission de l'acide 5-cétogluconique entre les carbones 4 et 5. L'autre produit de la réaction serait l'acide glycolique qui se transforme ensuite en acide oxalique. Cette hypothèse a conduit STAFFORD (1958) à rechercher si la concentration en acide tartrique n'augmentait pas dans les feuilles de haricot excisées, lorsqu'elles étaient alimentées par du 5-cétogluconate ou du gluconate. Les résultats n'ont pas confirmé cette hypothèse.

Ces travaux récents sont cependant compatibles avec l'opinion déjà exprimée par VICKERY et PALMER (1954) d'après laquelle l'accumulation de (+) tartrate dans certaines plantes est le résultat de la dégradation du D-glucose. Comme ce produit possède une configuration qui ne peut pas être attaquée rapidement par les systèmes enzymatiques présents, il tend à s'accumuler.

Respiration.

L'acide tartrique peut participer à la respiration générale de la plante et se transformer en gaz carbonique et en eau.

Il semble cependant, à la lumière des travaux de VICKERY et PALMER (1954) puis VICKERY (1957), que le (+) tartrate ne peut être dégradé par la feuille de tabac, qui normalement ne contient pas cet acide. Il s'accumule en effet dans les feuilles excisées sans qu'on puisse mettre en évidence une consommation quelconque. Son comportement diffère donc de celui du L-malate qui est facilement respiré dans les mêmes conditions. Ces auteurs ont trouvé que l'accumulation de tartrate n'a pas d'effet sur le métabolisme du malate. Ce résultat est en parfait accord avec le point de vue faisant dériver le (+) tartrate de la série D, il est alors normal qu'il se comporte comme le D-malate qui n'est pas un inhibiteur compétitif du L.

Un résultat analogue est signalé par PROKOSHEV et ROMANOVA (1956) qui ont utilisé des feuilles excisées de pomme de terre. Il faut noter cependant que VICKERY (1957) signale que l'acide tartrique peut interférer dans le métabolisme de l'acide citrique puisque ce dernier ne s'accumule plus dans les feuilles de tabac lorsqu'elles ont absorbé de l'acide tartrique à pH 3,9-2,8.

GERBER (1896) a été le premier à indiquer que l'oxydation de l'acide tartrique ne se produit qu'à température élevée. FLANZY (1948) confirme que dans la maturation du raisin, on observe bien une combustion de l'acide tartrique, surtout dans les années très chaudes. Le phénomène de la respiration de l'acide tartrique apparaît nettement dans les études d'OURNAC (1952) sur la maturation artificielle du raisin. Pour les baies récoltées avant leur maturité naturelle, l'acide malique est dégradé alors que l'acide tartrique reste stable, ensuite au fur et à mesure qu'avance la maturité, on voit augmenter l'activité du système responsable de son oxydation.

Dans la maturation sur pied, le phénomène est moins net car on n'observe dans les grains de raisin que la somme de deux phénomènes, l'apport de l'acide tartrique venant des feuilles et sa combustion. Les très nombreux mémoires

consacrés à la maturation du raisin sont assez unanimes à reconnaître que l'acide tratrique est dégradé beaucoup moins rapiement que l'acide malique. D'après PEYNAUD et MAURIE (1953)., l'acide tartrique est à peu près constant au cours de la maturation des raisins blancs, alors qu'il diminue dans celle des raisins rouges. Les observations plus poussées publiées par les mêmes auteurs (1956) les conduisent à admettre que la combustion et la migration de cet acide sont des phénomènes peu marqués et discontinus.

Le comportement de l'acide tartrique au cours de la maturation du raisin a été décrit d'une façon analogue à la suite d'observations faites sur des climats et avec des cépages différents. ROBINSON, SHAULIS, SMITH , TALLMAN (1959) trouvent que la concentration exprimée en gramme par litre de jus reste à peu près constante ou diminue très peu au cours de la maturation du cépage Concord aux Etats-Unis.

Les variations de la concentration en acide tartrique ont aussi été suivies par MANOTAS (1953) pendant la maturation de la fève de cacao. On la voit augmenter puis se stabiliser bien que la concentration en glucose diminue fortement.

Les conditions particulières dépendant du climat ou de la culture peuvent avoir une influence sur la concentration du jus de raisin en acide tartrique. PEYNAUD et MAURIE (1956) signalent qu'elle peut diminuer à la suite d'une période de sécheresse. G. RIBEREAU-GAYON (1959 *a*) a trouvé que les actions au niveau des racines, arrosage ou sécheresse artificielle, font augmenter la quantité d'acide présente dans les grains. Dans cette expérience, les deux cépages étudiés se comportent de façon différente. Le Merlot présente un excès d'acide tartrique alors que le Cabernet présente un excès d'acide malique. Dans une autre expérience, où les ceps ont été protégés de la lumière solaire, on observe une augmentation de l'acide malique, ce qui est conforme au fait bien connu que l'éclairement hâte la combustion de cet acide. On pourra comparer par exemple les résultats analogues trouvés par GYR (1956) avec les feuilles de *Pelargonium*. Au contraire, lorsque l'on considère la concentration en acide tartrique, on constate qu'elle reste à peu près constante dans *Pelargonium* et que, dans les ceps placés à l'ombre, elle tendrait même à diminuer.

3° Circulation de l'acide tartrique dans les plantes.

On sait peu de choses de cette question, mais après la mise en évidence par LA RIVIÈRE (1958) d'un système enzymatique régissant la perméabilité spécifique des isomères du tartrate chez les bactéries, on peut se demander si un mécanisme analogue n'interviendrait pas chez les plantes. Cela est peu vraisemblable, car les expériences de VICKERY et PALMER (1954) puis VICKERY (1957) indiquent que l'acide tartrique, bien que non métabolisé, est absorbé comme les autres acides organiques par les feuilles excisées du tabac.

L'action des divers isomères sur la croissance d'une plante ne contenant pas normalement d'acide tartrique est rapportée par AASHEIM (1958). Le test choisi est l'élongation des racines de *Lepidium sativum* ayant germé dans des solutions de ces isomères. L'acide (+) tartrique ne produit aucune inhibition, le (—) ne devient inhibiteur qu'après 64 h de contact. Le méso est plus inhibiteur que le (—) et c'est le racémate qui se révèle comme le plus toxique.

CHAPITRE IV

MÉTABOLISME DE L'ACIDE TARTRIQUE PAR LES ANIMAUX

L'acide tartrique peut entrer dans l'alimentation normale de l'homme et des animaux domestiques. C'est le cas pour les populations qui consomment les dérivés de la vigne, raisin ou vin, et pour les animaux qui sont nourris avec les sous-produits de la viticulture. Pendant les périodes de disette, on a fait consommer aux chevaux et surtout aux moutons des sarments ou des feuilles de vigne ensilés. Les moutons acceptent volontiers le marc de raisin dont la principale valeur alimentaire réside dans les lipides apportés par les pépins. Il contient en outre une quantité de tartrate pouvant atteindre 5 p. 100 du poids sec. Il existe à l'heure actuelle des troupeaux de moutons qui consomment pendant tout l'hiver 2 à 3 kg de marc par tête et par jour. Le résultat de cette alimentation paraît tout à fait satisfaisant aux éleveurs.

Pendant longtemps, l'acide tartrique a été l'un des acides organiques les plus utilisés dans la pharmacopée et dans la préparation des produits alimentaires. Actuellement l'acide citrique, qui peut être obtenu assez facilement par fermentation, le concurrence avec succès dans ces utilisations. Cependant, les pays anglo-saxons, grands consommateurs de levures chimiques « baking powders » qui sont des mélanges de carbonate et d'acide tartrique, continuent à en utiliser des quantités importantes.

Il est donc normal que l'on se soit préoccupé de rechercher si l'ingestion de l'acide tartrique ne possède pas d'effets défavorables sur l'organisme, et ensuite de savoir comment il s'y transforme. Quelques-unes de ces études, et des plus importantes, ont été patronnées par les fabricants de levures chimiques.

BRION (1898) semble avoir été le premier à s'intéresser à cette question. Il a comparé la vitesse à laquelle sont dégradés chacun des trois isomères administrés au chien par voie buccale. Assez paradoxalement, il trouve que c'est l'isomère naturel (+) qui est plus stable que le (—) et le méso. L'expérience a été répétée sur l'homme par BAUER et PEARSON (1957) et elle confirme ce qui avait été trouvé sur le chien. NEUBERG et SANEYOSHI (1911) trouvent au contraire que les trois isomères disparaissent à la même vitesse.

Ces travaux physiologiques se heurtaient à de grandes difficultés pour le dosage de l'acide tartrique à faible concentration. C'est pourquoi les auteurs précédents ont fait ingérer à leurs animaux d'expérience des quantités importantes de produit, introduisant ainsi un doute sur la valeur physiologique de leurs essais. UNDERHILL, PETERMAN et KRAUSE (1931) ont proposé une microméthode colorimétrique de dosage de l'acide tartrique, utilisant la coloration bleue qu'il donne en présence de métavanadate. Son application à l'étude du métabolisme du tartrate chez les animaux de laboratoire a été faite par UNDERHILL, LEONARD, GROSS, JALESKI (1931). L'acide tartrique se retrouve intégralement dans l'urine du lapin lorsqu'il a été ingéré on injecté en faible quantité. Lorsque la dose angmente, on n'en retrouve plus qu'une partie dans l'urine. On ne trouve pas de relation entre l'absorption d'acide tartrique et l'excrétion azotée. Le chien et le rat n'ont pas un comportement différent de celui

du lapin. Chez le cobaye, au contraire, le tartrate subit une altération dans le tractus digestif. Le métabolisme de l'acide tartrique dans l'organisme humain a été étudié par UNDERHILL, PETERMAN, JALESKI et LEONARD (1931). Une partie de cet acide, lorsqu'il est ingéré, est excrétée en 10 heures par le rein. Cette quantité relativement faible, environ 20 p. 100, représente ce qui a été absorbé par le petit intestin. Le reste ne se retrouve jamais dans les fèces. Ces auteurs ont mis en évidence, par des expériences in vitro, que la flore du caecum peut dégrader entièrement le tartrate au bout de 4 heures. Ces résultats sont confirmés par les recherches de FINKLE (1933), qui trouve que l'acide tartrique n'est pas comburé par l'organisme humain ou celui des animaux. Les résultats contraires trouvés chez le chien sont imputables d'après lui à des méthodes de dosage peu sensibles, et surtout à l'utilisation de concentrations trop importantes qui lèsent les reins et retardent ainsi l'élimination.

Plus récemment, la présence d'acide tartrique a été reconnue dans l'urine de l'homme normal par OSTEUX et LATURAZE (1954), et par NORDMANN, GAUCHERY, du RUISSEAU, THOMAS et NORDMANN (1954). Il est vraisemblable qu'il s'agit de l'excrétion de l'acide tartrique présent dans l'alimentation des sujets.

Au point de vue toxicologique, on doit signaler que le tartrate, du moins, lorsqu'il est injecté, peut provoquer des néphrites chez l'animal. Chez le lapin, des nécroses rénales peuvent apparaître après injection de 200 à 300 mg/kg. Ces études, dues à UNDERHILL et coll. (1931) ne précisent pas si le tartrate possède une activité spécifique sur le rein ou si son comportement est analogue à celui d'autres acides organiques qui ne seraient pas assimilés par l'organisme.

En résumé, l'acide tartrique qui arrive jusqu'au gros intestin subit une dégradation microbienne, celui qui est absorbé par le petit intestin, ou celui qui est introduit directement dans la circulation est éliminé par le rein.

CHAPITRE V

LES ENZYMES DU MÉTABOLISME DE L'ACIDE TARTRIQUE

L'acide tartrique peut servir de substrat à des réactions enzymatiques diverses, mais jusqu'ici les enzymes n'ont pu être isolées ni préparées dans un état de pureté suffisante, pour qu'on puisse leur attribuer une dénomination certaine. Ce que nous allons décrire est davantage l'activité enzymatique de certaines préparations que les enzymes elles-mêmes.

1° Transport actif des divers isomères.

L'existence d'un tel système a été proposée pour la première fois par SHILO et STANIER (1957). Ils remarquent en effet, ce qui est confirmé par LA RIVIÈRE (1958), que l'oxydation de l'un des isomères de l'acide tartrique par les extraits bactériens peut être inhibée par un autre isomère, alors que ce phénomène ne se produit pas avec les cellules non proliférantes. En outre, les cellules peuvent perdre rapidement la propriété de dégrader le (+) tartrate, tout en conservant une activité de déshydratase dans les extraits qui en dérivent. Ces deux faits s'expliquent si l'on admet qu'il existe des systèmes enzymatiques spécifiques

responsables de la pénétration du tartrate dans la cellule. Cette façon de voir a été acceptée par COHEN et MONOD (1957), qui pensent qu'il s'agit dans ce cas d'un système analogue à celui qu'ils ont étudié chez *E. coli*.

L'étude avec des microorganismes du transport des tartrates, indépendamment de leur métabolisme, a été entreprise par LA RIVIÈRE (1958) en utilisant des molécules radioactives. Ce système peut être bloqué en arrêtant la fourniture d'énergie, soit par le dinitrophénol, soit par l'anaérobiose complète. L'absorption de chacun des isomères constitue un processus adaptatif spécifique.

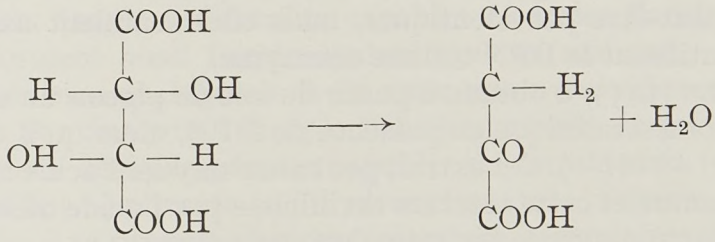
Nous avons déjà vu que ce transport actif ne se retrouve plus lorsqu'on considère l'absorption de solutions de tartrate par les feuilles du tabac : VICKERY et PALMER (1954).

2° Phosphorylation de l'acide tartrique.

La synthèse de l'ester monophosphorique de l'acide (+) tartrique a été réalisée par NEUBERG et SCHUCHARDT (1936). Soumis à l'action de diverses préparations de levures, de moisissures de muscles ou de reins, on constate qu'il est simplement hydrolysé sans qu'on puisse mettre en évidence sa transformation en acide oxalacétique ou pyruvique. Il semble cependant que cet ester phosphorique puisse intervenir dans le métabolisme de l'acide tartrique. C'est ainsi que la partie soluble de l'extrait de *Ps. incognita* préparée par NOMURA et SAKAGUCHI (1955) décarboxyle cinq fois plus vite le phospho-tartrate que le tartrate. On peut donc penser que l'extrait placé en anaérobiose manque d'un système capable de former une liaison phosphate riche en énergie et qu'une telle activation est indispensable pour que la décarboxylation ultérieure du tartrate devienne possible.

3° Activité des deshydratases

Plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence avec des bactéries ou des extraits enzymatiques la réaction suivante :



Cette réaction laisse supposer la présence d'une déshydratase.

NOMURA et SAKAGUCHI (1955) paraissent avoir été les premiers à fournir des arguments qui tendent à montrer que la première réaction qui intervient dans la décomposition anaérobie de l'acide (+) tartrique par *Ps. incognita* est sa transformation en oxalacétate. La principale raison que donnent les auteurs pour appuyer leur opinion est que la décarboxylation du tartrate et de l'oxalacétate sont toutes les deux inhibées dans les mêmes conditions par le $\alpha\alpha'$ dipyridyle et le malonate.

KRAMPITZ et LYNEN (1956) ont montré que l'acide oxalacétique ne pouvait être mis en évidence directement à cause de sa grande réactivité. Il s'accumule dans le milieu lorsqu'on y introduit de l'hydroxylamine avec laquelle il se combine pour donner une oxime qui a été identifiée par spectrophotométrie.

Dans les extraits préparés à partir de la bactérie utilisée par ces auteurs, cette activité enzymatique résiste 75 secondes à 64° alors que l'activité décarboxylante et la déshydrogénase de l'acide malique sont entièrement inactivées.

On peut aussi, comme l'ont fait SHILO (1957) et LA RIVIÈRE (1958), obtenir l'accumulation de l'oxalacétate en ajoutant de l'éthylènediaminetétracétate dans le milieu réactionnel. Ce corps inhibe en effet la décarboxylation enzymatique de l'acide oxalacétique. SHILO (1957) a trouvé que le métabolisme des tartrates par *Pseudomonas* procède par des déshydratases adaptatives stéréospécifiques. L'étude des inhibiteurs montre qu'ils font preuve de stéréospécificité. Les faits rapportés suggèrent que les points de combinaison de la déshydratase avec le substrat sont spécifiques des configurations D et L, et aussi qu'un seul des carbones asymétriques est impliqué dans la combinaison enzyme-substrat. C'est celui qui a la même configuration dans le méso et dans le (+) tartrate.

Ces conclusions sont confirmées par l'expérimentation de LA RIVIÈRE (1958) qui a aussi trouvé ces déshydratases spécifiques chez *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia*, mais non pas chez *Bacillus et Cryptococcus laurentii*.

A la lumière de ces travaux, il semble que la dégradation bactérienne du tartrate passe, quel que soit le microorganisme considéré, par l'intermédiaire de l'oxalacétate, qui est le produit commun permettant aux trois isomères de rentrer dans le métabolisme général. La réaction enzymatique paraît simple puisque les extraits ne semblent nécessiter l'addition d'aucun effecteur ou coenzyme. Comme toutes les expériences ont été faites en présence de tampon phosphate, il n'est pas possible de dire si les ions phosphates se montrent indispensables.

L'existence de cette déshydratase chez les végétaux est signalée par STAFFORD et LOEWUS (1958), elle est spécifique de l'acide (—) tartrique.

4° **Activité déhydrogénasique.**

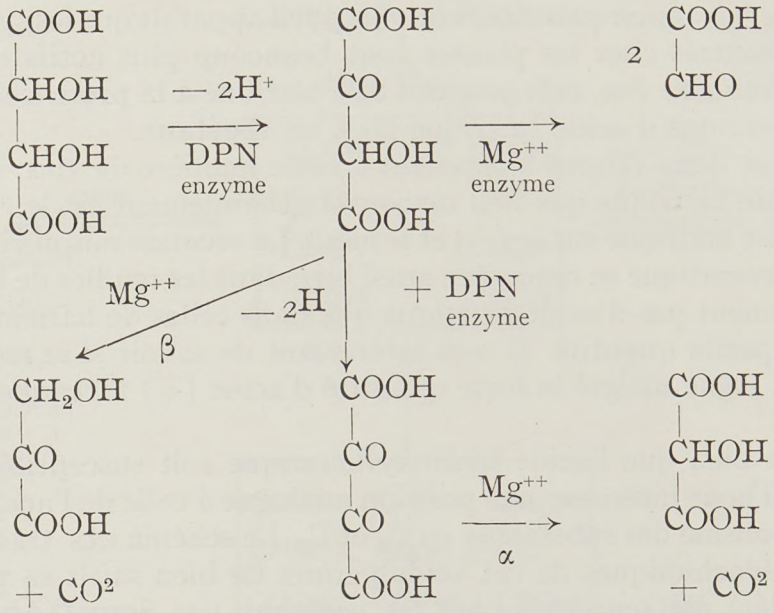
Dans les plantes et les animaux supérieurs, on est parvenu à mettre en évidence des activités enzymatiques d'oxydation, qui conduisent aux mêmes produits que l'oxydation spontanée des solutions de tartrate. Ces déhydrogénases ne sont peut-être pas identiques, mais elles semblent assez analogues, puisque toutes utilisent le DPN comme coenzyme.

SCHOLEFIELD (1955) a obtenu à partir de foie de pigeon un extrait capable d'oxyder l'acide mésotartrique en présence de DPN, alors qu'il est sans action sur les isomères (+) et (—). Cet extrait peut aussi oxyder l'acide malique en présence de ferricyanure et cette réaction est inhibée par l'acide mésotartrique. Le produit de la réaction avec le tartrate n'est pas précisé.

Un autre système a été découvert par KUN et DAVIES (1956) dans les mitochondries du cœur de bœuf. Il est capable d'oxyder le tartrate en deux stades en utilisant le DPN comme accepteur d'hydrogène. Expérimentalement, ce sont les réactions inverses qui sont réalisées.

KUN et HERNANDEZ (1956) ont pu montrer que ces activités déshydrogénasiques sont couplées à un système cytochromique, qui est utilisé comme transporteur final d'électron. On le trouve non seulement dans le foie de bœuf mais dans tous les organes essayés. Ce système est plus actif sur l'isomère (—) que sur le méso. Il est possible de le faire passer en solution, et dans ce cas, le méso est plus facilement attaqué que le (—). Le métabolisme de ces deux acides est différent puisque le rapport $\frac{CO_2}{O_2}$ est égal à $\frac{0,45}{0,53}$ pour l'isomère (—) et à $\frac{0,87}{1,65}$ pour le

méso. Les auteurs proposent le schéma de dégradation suivant, dans lequel interviennent des réactions enzymatiques et des réactions purement chimiques.



(α et β réactions non enzymatiques inhibées par le versène.)

Les deux réactions chimiques ne paraissent pas réversibles parce que, lorsqu'on ajoute de l'hydroxypyruvate et du tartronate, il ne se forme pas d'acide glyoxylique. Les acides ont été identifiés par chromatographie de leur 2,4-dinitrophénylhydrazone.

Kun (1956) a pu démontrer l'oxydation du dihydroxyfumarate par le DPN, avec des mitochondries. Cette réaction ne se produit que lorsqu'elle est couplée avec un système de diaphorase oxydant le DPN H. Ceci explique peut-être les résultats négatifs obtenus par Stafford, Magaldi et Vennesland (1954) qui ne sont pas arrivés à oxyder le dihydroxyfumarate.

En solution, les acides oxaloglycolique et dihydroxyfumarique sont en équilibre et les ions Mg^{++} catalysent la transformation de la forme énolique en forme cétonique.

D'après Kun (1956) les extraits capables d'oxyder l'acide dihydroxyfumarique transforment aussi l'acide oxalacétique en malique.

Des activités bien analogues ont été aussi mises en évidence dans les végétaux supérieurs par Stafford (1957). Dans les extraits de pois, de haricot et de blé, il existe des déshydrogénases capables de transformer, en présence de DPN le méso et le (—) tartrate en dihydroxyfumarate. Comme les extraits ne sont pas purifiés, il se produit plusieurs réactions secondaires qui empêchent d'identifier les produits de l'activité déshydrogénasique. Ces préparations ne donnent pas de glyoxylate et d'hydroxypyruvate comme celles de Kun et Hernandez (1956). Autre différence, les déshydrogénases se trouvent surtout dans la partie soluble.

Ce système enzymatique diffère par sa stéréospécificité de celui rencontré chez les microorganismes. Shilo (1957) a déduit de l'étude des substrats et de celle des inhibiteurs que l'enzyme extraite de *Pseudomonas* se combine avec le carbone qui a la même configuration stéréochimique dans le (+) et le méso tartrate. Cette façon de voir n'est pas en désaccord avec les faits rapportés par les autres expérimentateurs. Chez les plantes, d'après les travaux de Stafford (1957), les enzymes mises en évidence paraissent agir sur le carbone qui a la même configuration stéréochimique dans le (—) et le mésotartrate.

3. — *HYDROXYFUMARATE DÉCARBOXYLASE*

La solution préparée par KUN (1956) à partir des mitochondries du cœur de bœuf est capable de décarboxyler enzymatiquement le dihydroxyfumarate en hydroxypyruvate. Le seul cofacteur mis en évidence est le Mg^{++}. Le versène est inhibiteur. La réaction peut aussi se produire spontanément avec Mg^{++} comme catalyseur. Elle est analogue à la décomposition de l'oxalacétate en pyruvate.

D'après NEUBERG et SCHWENK (1915) l'acide hydroxypyruvique se produit aussi lors de la fermentation de l'acide dihydroxyfumarique par la levure.

4. — $DPNH_2$ → *DICETOSUCCINATE TRANSHYDROGÉNASE*

STAFFORD, MAGALDI, VENNESLAND (1954 *b*) préparent, à partir des graines, des tiges et des racines des plantes supérieures, une enzyme à DPN fonctionnant dans le sens dicétosuccinate vers dihydroxyfumarate. La réaction inverse n'a pu être mise en évidence.

KUN (1956) a extrait des mitochondries du cœur de bœuf, une enzyme analogue ; il a pu montrer une accélération de l'oxydation du dihydroxyfumarate par le DPN, ce qui tendrait à prouver que la réaction est réversible.

5. — *DIHYDROXYFUMARATE PEROXIDASE*

L'oxydation de l'acide dihydroxyfumarique peut se faire par l'oxygène ou l'eau oxygénée. Cette activité enzymatique a été démontrée dans le raifort et dans le navet par SWEDIN et THEORELL (1940), CHANCE (1952) KEILIN et HARTREE (1951), KENTEN et MANN (1953), MASON (1957). Ce système est activé par Mn^{++}, il est inhibé par Cu^{++}, la catalase, le cyanure et quelquefois par CO. Deux réactions paraissent se faire simultanément :

$$\text{dihydroxyfumarate} + O_2 \xrightarrow[Mn^{++}]{\text{transhydrogénase aérobie}} H_2O_2 + \text{dicétosuccinate}$$

$$\text{dihydroxyfumarate} + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + \text{dicétosuccinate}$$

D'après MASON (1957), ce système est capable de transférer l'oxygène atmosphérique sur les substrats aromatiques. La démonstration a été faite dans le cas de la vigne par RODOPOULO (1957). Grâce à ces réactions, l'acide dihydroxyfumarique pourrait jouer dans les plantes un rôle analogue à celui de l'acide ascorbique.

6. — *HYDROXYFUMARATE* → O_2 *TRANSHYDROGÉNASE*

La réaction d'oxydation du dihydroxyfumarate se produit spontanément à l'air. Elle est catalysée par les sels de Fe et Cu et inhibée par le cyanure. WIELAND et FRANKE (1928) montrent que la réaction peut aussi être catalysée par des enzymes.

BANGA et SZENT-GYÖRGYI (1938) obtiennent des extraits actifs à partir de diverses plantes : raifort, radis, oignon, asperge...

L'activité est mesurée au Warburg et le pH optimum va de 3 à 6. Le cyanure n'est pas inhibiteur et l'extrait n'agit pas par les traces métalliques qu'il contient.

7. — *REACTION CHIMIQUE ET CARBOXYLASE*

L'hydroxymalonate a été identifié par FENTON (1897) comme principal

produit de la décomposition spontanée du dicétosuccinate. La réaction purement chimique est indiquée par KUN (1956). Elle peut être catalysée par la levure comme l'ont montré NEUBERG et KARCZAG (1911).

8. — *RÉACTIONS CHIMIQUES*

La décomposition du dicétosuccinate catalysée par le Fe^{++} conduit au glyoxal, et FENTON et RYFFEL (1902) ont des raisons de croire que le semialdéhyde cétomalonique serait un intermédiaire.

9. — *D-GLYCÉRATE → DPN TRANSHYDROGÉNASE*

STAFFORD, MAGALDI et VENNESLAND (1954 *a*) l'ont extraite des plantes supérieures, surtout des feuilles de persil. C'est une enzyme à DPN, différente de la déshydrogénase lactique du muscle, qui réduit l'hydroxypyruvate en L-glycérate. Elle n'agit pas sur le pyruvate.

L'activité de cette enzyme n'apparaît pas dans les expériences faites avec des algues par MILHAUD, BENSON et CALVIN (1956) : dans ce cas, l'hydroxypyruvate ne donne jamais de l'acide glycérique, mais de l'acide glycolique.

10. — *RÉACTION CHIMIQUE ET CARBOXYLASE*

L'aldéhyde glycolique a été identifié par FENTON (1897) comme le principal produit de décomposition du dihydroxyfumarate.

La carboxylase extraite de la levure par HOLZER, GOEDDE, SCHNEIDER (1955) transforme aussi l'acide hydroxypyruvique en glycolaldéhyde.

11. — *TARTRATE DESHYDRATASE*

Cette activité enzymatique a déjà été analysée dans les pages précédentes.

12. — *MALATE → DPN TRANSHYDROGÉNASE*

Ce système enzymatique est maintenant bien connu. On pourra se référer à l'excellente mise au point de OCHOA (1952).

13. — *GLYOXALATE → DPN TRANSHYDROGÉNASE*

Déshydrogénase à DPN rencontrée par KUN, DECHARY et PITOT (1954) dans les extraits de foie. Cette activité n'a pas été retrouvée par STAFFORD (1957) dans les extraits végétaux.

14. — *GLYOXAL → O_2 TRANSHYDROGÉNASE*

L'extrait de feuille préparé par KOLESNIKOV (1953) est capable d'oxyder le glyoxal en glyoxylate.

15. — *$DPNH_2$ → MESOXALATE TRANSHYDROGÉNASE*

Cette réduction est signalée par FENTON (1905). BARAUD (1954) trouve de l'acide mésoxalique dans les produits de la dégradation de l'acide tartrique en présence de Fe^{++},

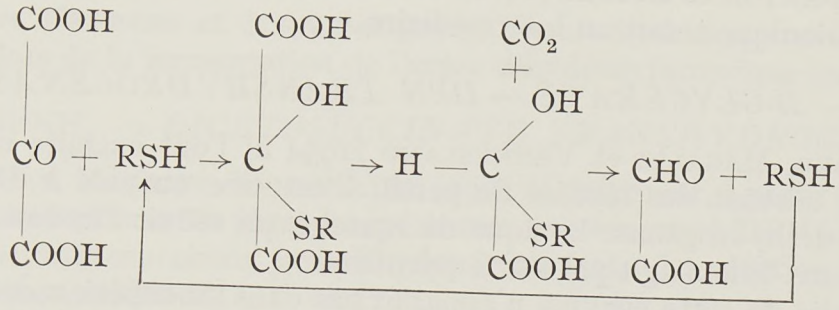
La réduction de l'acide mésoxalique en acide tartronique a été obtenue avec le foie de souris par OCHIAI, OKAMOTO et UEDA (1955).

Dans les plantes, STAFFORD (1956 *b*) a montré que cette réduction fait intervenir le DPN et que la réaction est réversible.

16. — *MESOXALATE DECARBOXYLASE*

Lachman (1921) a trouvé qu'il se forme de l'acide glyoxylique dans la dégradation spontanée de l'acide dihydroxyfumarique.

La décarboxylation de l'acide mésoxalique se produit par voie biologique, elle conduit à l'acide glyoxylique. D'après Guitton et Brunel-Capelle (1956), cette réaction fait intervenir un composé à radical — SH comme catalyseur :



17. — *$DPNH_2$ → GLYOXYLATE DÉSHYDROGÉNASE*

Zelitch (1953) a préparé à partir des feuilles d'épinard une enzyme à DPN qui fonctionne réversiblement. L'acide glyoxylique formé peut servir comme transporteur d'oxygène dans le système suivant :

$$\text{Glucose} + \text{DPN} + H_2O \rightarrow \underset{\text{(glucose deshydrogénase)}}{\text{Acide gluconique}} + \text{DPNH} + H^+$$

$$\text{DPNH} + H^+ + \text{acide glyoxylique} \rightarrow \underset{\text{(deshydrogénase de l'acide glycolique)}}{\text{DPN} + \text{acide glycolique}}$$

$$\text{acide glycolique} + O_2 \rightarrow \underset{\text{(oxydase de l'acide glycolique)}}{\text{acide glyoxylique} + H_2O_2}$$

$$H_2O_2 \rightarrow \underset{\text{(catalase)}}{H_2O + 1/2\ O_2}$$

La somme de ces réactions est :

$$\text{Glucose} + 1/2\ O_2 \rightarrow \text{acide gluconique.}$$

18. — *GLYCOLATE → O_2 TRANSHYDROGÉNASE*

Cette enzyme a été trouvée dans les feuilles de tabac, les feuilles d'épinard et le foie des mammifères. Clagett, Tolbert et Burris (1949), Zelitch et Ochoa (1953), Kun (1953).

Il s'agit d'un système dont le cofacteur est la flavine-mono-nucléotide. L'eau oxygénée formée dans cette réaction peut servir à des peroxydases. Elle peut aussi réagir non enzymatiquement sur le glyoxylate en donnant :

$$\begin{matrix}\text{CHO}\\ |\\ \text{COOH}\end{matrix} + H_2O_2 \rightarrow H - \text{COOH} + CO_2 + H_2O$$

19. — *CONDENSANT ACETYL CoA → GLYOXYLATE TRANSACÉTYLASE*

Elle accomplit la réaction suivante :

$$H_2O + \text{glyoxylate} + \text{acétyl CoA} \rightarrow \text{malate} + \text{CoA}$$

Réaction découverte par Wong et Ajl (1956) chez *E. coli* et retrouvée aussi dans la graine de ricin, par Beevers et Kornberg (1957).

CONCLUSION

Beaucoup d'êtres vivants sont capables de dégrader l'acide tartrique, alors que sa synthèse paraît être restreinte à des groupes très spécialisés. Son métabolisme par les microorganismes paraît simple, il se transforme en acide oxalacétique qui est ensuite repris par la voie du cycle de Krebs. Les nombreux travaux qui traitent de ce sujet nous semblent tout à fait concluants et paraissent laisser peu de place à de grandes découvertes nouvelles. Comme aliment de l'homme et des animaux, l'acide tartrique semble dépourvu d'intérêt puisqu'il est directement éliminé par le rein et dégradé par la flore digestive.

C'est à la physiologie végétale que l'acide tartrique pose les problèmes les plus intéressants. Nous savons encore très peu de chose sur son origine, et les travaux poursuivis jusqu'à ce jour ont eu pour principal résultat d'éliminer des hypothèses, en particulier celle qui le ferait dériver de l'acide malique.

Nous ne savons absolument rien sur les causes qui provoquent son accumulation dans certains organes végétaux, et pourtant c'est là une particularité caractéristique de cet acide. Contrairement à ce que l'on a observé chez les microorganismes, l'acide tartrique ne paraît pas pénétrer dans le cycle de Krebs par la voie de l'oxalacétate. Alors que l'acide malique peut être rapidement synthétisé ou dégradé, l'acide tartrique possède un métabolisme beaucoup plus lent, même dans les plantes qui en renferment des proportions importantes.

L'attention qui se concentre à nouveau sur l'acide dihydroxyfumarique permettra peut-être de mieux connaître ce métabolisme particulier au règne végétal. Il est certain que cet acide, dont l'instabilité chimique est bien connue, peut subir de nombreuses transformations de nature enzymatique ou bien chimique. Quelques-unes de ces réactions paraissent couplées avec le métabolisme général de la plante, et pourraient indiquer les principales voies de transformation de l'acide tartrique. Bien que l'acide dihydroxyfumarique ne possède pas de propriétés anti-scorbutiques, on s'est plu à souligner les analogies qui le rapprochent de l'acide ascorbique. Cependant nos connaissances ne sont pas encore suffisantes pour affirmer qu'ils jouent tous les deux le même rôle dans le métabolisme végétal.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aasheim (T.). — Effect of stereoisomeric tartrates on root elongation in *Lepidium*. *Nature*, **181**, 922-3, 1958.

Airan (J. W.) et Barnabas (J.). — Organic acids and sugars in *Lycopersicon esculentum*. *J. Univ. Bombay*, **22**, Pt. 3, Sci. nº 34 B, 29-31, 1953.

Alsberg (C. L.) et Black (O. F.). — Contribution to the study of maize deterioration biochemical and toxicological investigations of *Penicillium puberulum* and *Penicillium stoloniferum*. *U. S. Dep. Agr. Bureau Plant. Ind. Bull.*, **270**, 1-47, 1913.

ARENA (A.). — Alteraciones bacterianas de vinos argentinos. *Revista de la Facultad de agronomia y veterinaria Buenos-Aires*, **8**, 155-318, 1936.
AXELROD (B.). — Hazards of dihydroxymaleic acid. *Chem. Eng. News.*, **33**, 3356, 1955.
BAARS (J. K.). — Over sulfaatreductie door bacteriën. *Thèse Delft.*, 1930.
BALARD. — Sur une altération spontanée de certains vins. *C. R. Ac. Sc.*, **53**, 1226-30, 1861.
BANGA (I.) et SZENT-GYÖRGYI (A.). — Dioxymaleinsäure-oxydase. *Z. Physiol. Chem.*, **255**, 57-60, 1938.
BARAUD (J.). — Une nouvelle méthode de dosage de l'acide ascorbique. *Bull. Soc. Chim.*, **18**, 837-44, 1951.
BARAUD (J.). — La réaction de la tartrazine appliquée à l'étude des vins. *Bull. Soc. Chim.*, **20**, 525-8, 1953.
BARAUD (J.). — Étude des dérivés naturels de l'acide tartrique. *Ann. Chim.*, **9**, 535-604, 1954.
BARCH (W. E.). — Oxidation of 5-Ketogluconic acid with nitric acid in the presence of vanadium. *J. Amer. Chem. Soc.*, **55**, 3653-8, 1932.
BARKER (H. A.). — On the fermentation of some dibasic C_4 acids by *Aerobacter aerogenes*. *Proc. Koninkl. Nederland. Akad. Wetenschap.*, **39**, 674, 1936.
BAUER (C. W.) et PEARSON (R. W.). — A comparative study of the metabolism in the human body of some isomers of tartaric acid. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **46**, 575-8, 1957.
BEDFORD (C. L.). — Morphological and physiological studies upon a *Penicillium* sp. tolerant to copper sulfate. *Zent. B. f. Bakt. II*, **94**, 102-12, 1936.
BEEVERS (H.) et KORNBERG (H. L.). — Isocitritase and malate synthease in a higher plant tissue. *Plant. Physiol.*, **32**, XXXI, 1957.
BEIJERINCK (M. W.) et MINCKMAN (D. C.). — Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zent. B. f. Bakt. II.*, **25**, 30-63, 1910.
BERGMANN (M.). — Abbau von d-Zuckersäure zum Dialdehyd der l-Weinsäure. *Ber. Chem.*, **54**, 2651-9, 1921.
BERNHAUER (K.). — Biochemie der Essigbakterien. *Ergeb. Enzymf.*, **7**, 243-80, 1938.
BERNHAUER (K.) et BÖCKL (N.). — Zum chemismus der durch *Aspergillus niger* bewirkten Säurebildungsvorgänge. *Biochem. Z.*, **253**, 16-30, 1932.
BHARUCHA (F. R.) et JOSHI (G. V.). — Organic acids of *Ricinus communis*. *Science and Culture (India)*, **19**, 565-6, 1954.
BIDAN (P.) et ANDRE (L.). — Sur la composition en acides aminés de quelques vins. *Ann. Techn. Agr.*, **7**, 403-32, 1958.
BIJOVET (J. M.), PEERDEMAN (A. F.) et VAN BOMMEL (A. J.). — Determination of the absolute configuration of optical active compounds by means of X-rays. *Nature*, **168**, 271-2, 1951.
BÖESEKEN (J.) et WATERMAN (H. J.). — Biochemical method of preparation of l-tartaric acid. *Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam.*, **15**, 212, 1912.
BORDAS (F.), JOULIN et de RACZOWSKI. — Sur les microorganismes des vins dits tournés. *C. R. Ac. Sc.*, **126**, 1050-3, 1898 (*a*).
BORDAS (F.), JOULIN et de RACZOWSKI. — Des microorganismes des vins tournés. *C. R. Ac. Sc.*, **126**, 1443-46, 1898 (*b*).
BRION (A.). — Uber die Oxidation der stereoisomeren Weinsäuren im thierischen Organismus. *Z. Physiol. Chem.*, **25**, 283-95, 1898.
BROWN (H. C.), DUNCAN (J. T.) et HENRY (T. A.). — The fermentation of salts of organic acids as an aid to the differentiation of bacterial types. *J. Hyg. Cambridge*, **23**, 1-22, 1925.
BUCHANAN (C.). — Configurational notation of the tartaric acids. *Nature*, **167**, 689-90, 1951.
BUTKEVITCH (V. S.) et MEL'NIKOVA (A. A.). — Dibasic acid containing four C atomes as intermediate products in the biological oxidation of hexoses to oxalic acid. *Ac. Sc. URSS.*, **39**, 148-50, 1943, C. A. **38**, 1835, 1944.

CHANCE (B.). — Oxidase and peroxidase reactions in the presence of dihydroxymaleic acid. *J. Biol. Chem.*, **197**, 577-89, 1952.
CHARPENTIE (Y.). — Étude biochimique de l'acidité des vins. *Ann. Techn. Agr.*, **3**, 89-168, 1954.
CHAUVET (J.). — Étude de la respiration de *Mycoderma vini*. *Enzymologia*, **11**, 57-69, 1943.
CHIAO-MU HSU. — Non volatile chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides*. *J. Taiwan. Pharm. Assoc.*, **3**, 2-7, 1951.
CLAGETT (C. O.), TOLBERT (N. E.) et BURRIS (R. H.). — Oxidation of α hydroxy acids by enzymes from plants. *J. Biol. Chem.*, **178**, 977-87, 1949.
CLELAND (V. W.) et JOHNSON (M. J.). — Studies on the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, **220**, 595-606, 1956.
COHEN (G. N.) et MONOD (J.). — Bacterial permeases. *Bact. Rev.*, **21**, 169-94, 1957.
CRANE (E. J.). — Nomenclature, spelling and pronunciation. *Chem. and Eng. News.*, **31**, 1776-82, 1953.
DALE (J. K.) et RICE (W. F.). — Preparation of l-tartaric acid by the oxidation of d-Gulonic lactone. *J. Amer. Chem. Soc.*, **55**, 4984-6, 1933.
DEIBNER (L.). — Données actuelles sur le processus de l'oxydation de l'acide tartrique et sur la séparation chromatographique des acides organiques du vin. *Ann. Techn. Agr.*, **5**, 141-57, 1956.
DESVEAUX (R.) et KOGANE. — Note sur les acides formés au cours de la germination du ricin. *Congrès International de Bota.* Sect. 11/12, 37-8, 1954.
DUCLAUX (E.). — Sur l'action antiseptique de l'acide formique. *Ann. Inst. Pasteur*, **6**, 593-600, 1892.
DUPUY (P.). — Action oxydante du *Mycoderma vini* sur certains composés du vin. *Ann. Techn. Agr.*, **1**, 125-131, 1952.
FALCK (R.) et VAN KINGMAN (B. T.). — Methodisches und Prinzipielles zur Darstellung organischer Säuren auf biologischem Wege mit Hilfe von Fadenpilzen. *Ber. Chem.*, **57**, 915-20, 1924.
FENTON (H. J.). — Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc.*, **65**, 899-910, 1894.
FENTON (H. J.). — A new synthesis in the sugar group. *J. Chem. Soc.*, **71**, 375-83, 1897.
FENTON (H. J.). — Further studies on dihydroxymaleic acid. *J. Chem. Soc.*, **87**, 804-818, 1905.
FENTON (H. J.) et JACKSON (H.). — The oxidation of polyhydric alcohols in presence of iron. *J. Chem. Soc.*, **75**, 1-11, 1899.
FENTON (H. J.) et RYFFEL (J. H.). — Mesoxalic semi-aldehyde. *J. Chem. Soc.*, **81**, 426-36, 1902.
FINKLE (P.). — The fate of tartaric acid in the human body. *J. Biol. chem.*, **100**, 349-55, 1933.
FISCHER (E.) et CROSSLEY (A. W.). — Oxydation der Zuckersäure und Schleimsäure mit Kaliumpermanganat. *Ber. Chem.*, **27**, 394-8, 1894.
FISCHER (E.). — Configuration der Weinsäure. *Ber. Chem.*, **29**, 1377-83, 1896.
FLANZY (M.). — Acides organiques dans les raisins et les vins. *Ann. Agr.*, **18**, 60-64, 1948.
FOSSE (R.) et HIEULE (A.). — Sur une réaction colorée supposée spécifique de l'aldéhyde formique, produite par l'acide glyoxylique. *C. R. Ac, Sc.*, **179**, 636-9, 1924.
FOSTER (J. W.) et CARSON (S. F.). — Metabolic exchange of carbon dioxide with carboxyls and oxidative synthesis of C_4 dicarboxylic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **36**, 219-30, 1950.
FRANZEN (H.) et HELWERT (F.). — Critique on the occurrence of tartaric acid in plants. *Biochem. Z.*, **136**, 291-305, 1923.

Fujii (M.) et Ukita (M.). — Prevention of white clouding of canned bamboo shoots. V Detection of organic acids and bases by paper chromatography. *J. Fermentation Technol. (Japan)*, **33**, 17-21, 1955.

Gakhokidze (A. M.). — Mechanism of formation of organic acids in plants. *Soobschtcheniya Akad. Nauk. Gruzinstroi SSSR.*, **10**, 25-31, 1949. C. A. **46**, 10307 e, 1952.

Gatet (L.). — Étude du pouvoir réducteur des jus de fruits au cours de la maturation. *Enzymologia*, **6**, 375-86, 1939.

Gattet (L.) et Genevois (L.). — Sur le pouvoir réducteur des vins. *Bull. Soc. Chim. France*, **8**, 485-7, 1941.

Gautier (A.). — Sur une maladie non encore décrite des vins du midi de la France dits vins tournés. *C. R. Ac. Sc.*, **86**, 1338-40, 1878.

Genevois (L.) et Gay (L.). — Sur les propriétés de l'acide dioxymaléique. *Procès verbal Soc. Sc. Phys. Nat. Bordeaux*, 2 février, 1939.

Genevois (L.) et Ribereau-Gayon (J.). — Le vin. *Paris-Hermann ed.*, 1947.

Gerber (G.). — Recherches sur la maturation des fruits charnus. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **4**, 8e série, 1-279, 1896.

Glasky (A. J.) et Rafelson (M. E.). — Pathway of carbon in acetate adapted *E. coli*. *Federation Proc.*, **16**, 186-7, 1957.

Glenard (A.). — Note sur la fermentation tartrique du vin. *Annales de la Société d'Agriculture de Lyon*, **6**, 1862.

Golovin (P. V.), Rominskii (I. R.) et Sushkova (A. S.). — Organic acids in Jerusalem artichokes and in sugar beets. *Ukrain. Khim. Zhur.*, **21**, 86-8, 1955. C. A. **49**, 8817 *c*, 1955.

Gorski (F.). — Utilization of the optical antipodes of racemic acid by *Aspergillus fumigatus* Fres. *Bull. intern. acad. polon. sci. Classe sci. math. nat. B.*, 89-105, 1937.

Gorski (F.). — Recherches sur l'utilisation des inverses optiques de l'acide racémique par les Aspergilles. *Bull. intern. acad. polon. sci. Classe sci, math. nat. B.*, 35-59, 1947.

Grimbert (L.) et Ficquet (L.). — Sur un nouveau ferment des tartrates, le *Bacillus tartricus*. *C. R. Soc. Biol.*, X, **4**, 962-5, 1897.

Guitton (Y.) et Brunel-Capelle (G.). — Sur la décarboxylation de l'acide mésoxalique. *C. R. Ac. Sc.*, **242**, 2057-9, 1956.

Gupta (M. P.). — The melocular configuration of the aliphatic dibasic acid $C_4H_4O_6$, $2H_2O$. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 6312-3, 1953.

Gyr (J.). — Les acides organiques des feuilles de *Pelargonium peltatum* et leurs variations en fonction de la durée de l'éclairement. *C. R. Ac. Sc.*, **242**, 1203-4.

Gyr (J.). — Oxydation respiratoire et β carboxylation chez le *Pelargonium peltatum L.* en fonction de la tension d'oxygène. *C. R. Ac. Sc.*, **248**, 445-7, 1959.

Hartree (F.). — On the configuration of the so-called Dihydroxymaleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 6244-9, 1953.

Herzog (R. O.) et Meier (A.). — Ueber Oxydation durch Schimmelpilzen. *Z. Physiol. Chem.*, **59**, 57-62, 1909.

Hessler (L. E.) et Gortner (R. A.). — The carbon metabolism of *Gilberella saubinetii* on glucose. *J. Biol. Chem.*, **119**, 193-200, 1937.

Hoffmann-Ostenhoff. — Suggestions for a more rational classification nda nomenclature of enzymes. *Advances in Enzymol*, **14**, 219-260, 1953.

Holzer (H.), Goedde (H. W.) et Schneider (S.). — Umsatz Oxybrenztraubensäure und Glycolaldehyde mit Carboxylase und Alkoholdehydrase auf Hefe. *Biochem. Z.*, **327**, 245-54, 1955.

Isbell (H. S.) et Holt (N. B.). — Oxidation of galacturonic acid and of 5-Ketogluconic acid in alkaline solution. *J. Research. Natl. Bur. Standards*, **35**, 433-8, 1945.

JACKSON (R. W.), KOEPSELL (H. J.), LOCKWOOD (L. B.), NELSON (G. E. N.) et STODOLA (F. H.). — Bacterial oxidations of sugars and metabolic intermediates. *I^st. Int. Congr. Biochem. Cambridge. Abstracts of communications*, **536**, 1939.

JACOBSOHN (K. P.) et de AZEVEDO (D.). — Étude sur la fermentation tartrique. *C. R. Soc. Biol.*, **149**, 1823-5, 1955.

JOHNS (A. T.). — The mechanism of propionic acid formation by *Veillonella gazogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 326-36, 1951.

DE JONG (L. E. den DOOREN). — Bijdrage tot de Kennis van het miner alisatieproces. *Thèse Delft.*, 1926.

JORDAN (E. O.) et HARMON (P. H.). — A new differential medium for the paratyphoid group. *J. Infectious Diseases*, **42**, 238-41, 1928.

HOUGH (L.) et JONES (J. K. N.). — The biosynthesis of the monosaccharides. *Advances in Carbohydrate chemistry*, **11**, 185-262, 1956.

KAMLET (J.). — Production of d-tartaric acid by fermentation. *U. S. Patent* 2.314.831, 23 *mars* 1943 (*Miles Laboratory Inc.*) *C. A.*, **37**, 5190, 1943.

KARCZAG (L.). — Uber die Gärung der verschiedenen Weinsäure. *Biochem. Z.*, **38**, 516-8, 1912.

KARCZAG (L.). — In welcher Weise wird die Weinsäure durch Hefe angegriffen? *Biochem. Z.*, **43**, 44-6, 1912.

KAUFFMAN (F.). — Enterobacteriaceae. *Copenhague*, 1954.

KEILIN (D.) et HARTREE (E. F.). — Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of Catalase and Methaemoglobin. *Biochem. J.*, **49**, 88-104, 1951.

KENTEN (R. H.) et MANN (P. J.). — The oxidation of certain dicarboxylic acids by peroxidase system in the presence of manganese. *Biochem. J.*, **53**, 498-505, 1953.

KIMURA (T.), KATAYAMA (H.) et SASAKAWA (T.). — Glyoxylate-oxaloacétate system of avian tuberculosis bacteria III Breakdown of tartrate and activation of oxalate, glycolate, glyoxylate and formate by adenosine triphosphate and coenzyme A system. *Symposia on Enzyme Chem. (Japan)*, **11**, 119-27, 1956. C. A. **50**, 14867 *c*, 1956.

KINOSHITA (K.). — Uber die Ernährung der Pilze mit den Kobaltammin Komplexsalzen. *Act. Phytochim. (Japan)*, **3**, 31-50, 1927. C. A., **22**. 1990, 1928.

KOLESNIKOV (P. A.). — Oxidation of glyoxal in extracts from green leaves *Doklady. Akad. Nauk. SSSR.*, **90**, 221-4, 1953. C. A. **47**, 8839 *b*, 1953.

KRAMER. — Die Bakteriologie in ihren Beziehungen zur Landwirtschaft und den landw. technischen Gewerben. *Vienne*, 1892.

KRAMPITZ (L. O.) et LYNEN (F.). — Formation of oxalacetate from *d* tartrate. *Federation Proc.*, **15**, 292-3, 1956.

KUDRIAVZEW (V. I.). — The systematic of yeast. *Moscou*, 1954.

KUN (E.). — Purification and properties of glycolic acid dehydrogenase of animal origin. *Federation Proc.*, **12**, 338-9, 1953.

KUN (E.). — Enzymatic mechanism of oxidation of tartrate. *J. Biol. Chem.*, **221**, 223-30, 1956.

KUN (E.) et DAVIES (D. D.). — Enzymatic components of the tartrate oxidizing system of beef heart mitochondria. *Federation Proc.*, **15**, 294, 1956.

KUN (E.), DECHARY (J. M.) et PITOT (H. C.). — The oxidation of glycolic acid by a liver enzyme. *J. Biol. Chem.*, **210**, 269-280, 1954.

KUN (E.) et HERNANDEZ (G. M.). — The oxidation of tartaric acid by an enzyme system of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **218**, 201-211, 1956.

KUZIN (A. S.) et DOMAN (N. G.). — Oxidation of dihydroxymaleic acid in the green plant leaf. *Doklady. Akad. Nauk. SSSR.*, **62**, 255-58, 1948. C. A. **43**, 726 *c*, 1949.

LABORDE (J.). — Sur le ferment de la maladie des vins poussés ou tournés. *C. R. Ac. Sc.*, **138**, 228-31, 1904.
LACHMAN (A.). — Dihydroxytartaric acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, **43**, 2091-97, 1921.
LA RIVIÈRE (J. W. M.). — On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. *Thèse Delft*, 1958.
LAURENT (E.). — Recherches physiologiques sur les levures. *Ann. Soc. Belge de Microscopie*, **14**, 29-120, 1890.
LOCKWOOD (L. B.) et NELSON (G. E.). — *d*-tartaric acid. *U. S. Patent* 2.559.650., July 10, 1951.
LOEWUS (F. A.) et STAFFORD (H. A.). — Observations on the incorporation of C_{14} into tartaric acid and the labellin pattern of D-glucose from an excised grape leaf administered L-ascorbic acid-6-C_{14}. *Plant. physiol.*, **33**, 155-6, 1958.
MAASSEN (A.). — Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Spaltpilze. Die organischen Säuren als Nährstoffe und ihre Zersetzbankeit durch die Bakterien. *Arb. Kaiserl. Gesund.*, **12**, 340-411, 1896.
MADER (C.) et WEBSTER (J. E.). — Quantitative measurement of the organic acids of sorghum sirup. *Food Technol.*, **8**, 171-3, 1954.
MANOTAS (L. E.). — The contents of sugar and organic acids in cacao pods and their probable relation to disease attact. *Acta Agron.* (*Colombia*), **3**, 177-88, 1953.
MAQUENNE (.) et BERTRAND (G.). — Sur les erythrites actives. *C. R. Ac. Sc.*, **132**, 1419-21, 1901.
MARTIN (W. R.) et FOSTER (J. W.). — Production of trans L epoxysuccinic acid by fungi and its microbiological conversion to mesotartric acid. *J. Bacteriol.*, **70**, 405-414, 1955.
MASON (H. S.). — The transfer of oxygene by peroxidase. *Proceeding of the I^st. Symp. on enzyme chemistry. Tokyo*, 1957.
MATHEW (K. T.). — The black rot of coffee. *Proc. Indian Acad. Sci.*, **39** *B*, 179-211, 1954. C. A. **48**, 11.550 *b*, 1954.
MAZE (P.) et PACOTTET (P.). — Recherches sur les ferments des maladies des vins. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, **18**, 245-63, 1904.
MERCER (W. A.) et VAUGHN (R. H.). — The characteristics of some thermophilic, tartratefermenting anaerobies. *J. Bact.*, **62**, 27-37, 1951.
MILHAUD (G.), BENSON (A. A.) et CALVIN (M.). — Metabolism of pyruvic acid 2-C_{14} and hydroxypyruvic acid 2-C_{14} in algae. *J. Biol. Chem.*, **218**, 598-606, 1956.
MÜLLER-THURGAU (H.). — Die Edelfäule der Trauben. *Landwirt. Jahrbücher*, **17**, 83-160, 1888.
MÜLLER-THURGAU (H.) et OSTERWALDER (A.). — Die Bakterien im Wein und die dadurch verursachten Veränderungen. *Zent. B. f. Bakt. II.*, **36**, 129-338, 1913.
MÜLLER-THURGAU (H.) et OSTERWALDER (A.). — Ueber die durch Bakterien verursachten Zersetuzung von Weinsaüre und Glyzerin im Wein. *Landw. Jahrb. der Schweiz.*, **33**, 313-61, 1919.
NEUBERG (C.) et KARCZAG (L.). — Uber zuckerfreie Hefegärungen. *Biochem. Z.*, **37**, 171-76, 1911.
NEUBERG (C.) et SANEYOSHI (S.). — Uber das Verhalten der stereoisomeren Weinsäuren im Organismus des Hundes. *Biochem. Z.*, **36**, 32-6, 1911.
NEUBERG (C.) et SCHUCHARDT. — Uber die Synthese der Phospho-d-weinsaüre und ihre phosphatatische Spaltung. *Enzymologia*, **1**, 39-47, 1936.
NEUBERG (C.) et SCHWENK (E.). — Die Gärung der Dioxymaleinsäure. *Biochem. Z.*, **71**, 104-113, 1915.
VAN NIEL (C. B.). — The propionic acid bacteria. *Thèse Delft*, 1928.
NIJDAM (H. W.). — *Aerobacter tartarivorum. These Leide*, 1907.

NOMURA (M.). — Decomposition of tartaric acid by microorganisms. *Symposia on Enzyme Chem. (Japan)*, **9**, 62-3, 1954.

NOMURA (M.) et SAKAGUCHI (K.). — The decomposition of L (+) tartrate by the microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol. (Japan)*, **1**, 77-98, 1955.

NORDMANN (R.), GAUCHERY (O.), DU RUISSEAU (J. P.), THOMAS (Y.) et NORDMANN (J.). — Le chromatogramme qualitatif de l'urine humaine normale. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1641-54, 1954.

OCHIAI (E.), OKAMOTO (T.) et UEDA (T.). — Biological change of mesoxali. acid. *J. Pharm. Soc. Japan*, **75**, 1445-8, 1955. C. A. **50**, 5162 *i*, 1956.

OCHOA (S.). — Enzymatic mechanismus of carbon dioxide fixation. *The enzymes, Acad. Press. New-York*, vol. II, 929-1029, 1952.

OHASHI (K.) et TAKAHASHI (T.). — Decomposition of glucose in alkaline solutions. *Research. Bull. Gifu. Cool. Agr. Japan*, **68**, 74-9, 1950.

OSTEUX (R.) et LATURAZE (J.). — Chromatographie sur papier des acides organiques fixes de l'urine. *C. R. Ac. Sc.*, **239**, 512-3, 1954.

PAL (J.) et SAHA (A. N.). — Oxidation of cane sugar to tartaric acid. *J. Indian Chem. Soc. Ind. et News. Ed.*, **16**, 47-9, 1953.

OSTERWALDER (A.). — Uber die durch Bakterien verursachte Zersetzung von Weinsäure und Glyzerin im Wein. Die Bakterien der Weinstein und Glyzerinzersetzung. *Landw. Jahrb. der Schweiz*, **53**, 181-197, 1952.

OURNAC (A.). — Recherches sur la maturation artificielle du raisin. *Ann. Techn. Agr.*, **1**, 85-105, 1952.

PASTEUR (L.). — Recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique et le sens de polarisation rotatoire. *C. R. Ac. Sc.*, **28**, 477-8, 1849.

PASTEUR (L.). — Notice sur l'origine de l'acide racémique. *C. R. Ac. Sc.* **36**, 19-26, 1853.

PASTEUR (L.). — Mémoire sur la fermentation de l'acide tartrique. *C. R. Ac. Sc.*, **46**, 615-18, 1858.

PASTEUR (L.). — Note relative au *Penicillium glaucum* et à la dissymétrie des produits organiques naturels. *C. R. Ac. Sc.*, **51**, 298-99, 1860.

PASTEUR (L.). — Nouvel exemple de la fermentation déterminée par des animalcules infusoires pouvant vivre sans gaz oxygène libre et en dehors de tout contact avec l'air de l'atmosphère. *C. R. Ac. Sc.*, **56**, 416-421, 1863.

PASTEUR (L.). — Études sur le vin. 2e *Ed. Paris*, 1873.

PASTEUR (L.). — Études sur la bière. *Paris*, 274, 1876.

PETIT (A.). — De la disparition des acides du raisin et de leur transformation en sucre. *C. R. Ac. Sc.*, **69**, 760-2, 1869.

PEYNAUD (E.). — Note sur le dosage de l'acide d-tartrique par la méthode au racémate à l'aide d'un extrait de *Bauhinia reticulata* D. C. *Bull. Soc. Chim. France*, **18**, 911-12, 1951.

PEYNAUD (E.) et MAURIE (A.). — Évolution des acides organiques dans le grain de raisin au cours de la maturation en 1951. *Ann. Techn. Agr.*, **2**, 83-95, 1953.

PEYNAUD (E.) et MAURIE (A.). — Nouvelles recherches sur la maturation du raisin dans le Bordelais. Années 1952-53-54. *Ann. Techn. Agr.*, **4**, 111-39, 1956.

PFEFFER (W.). — Ueber Election organischer Nährstoffe. *Jahrbücher wiss. Botanik*, **28**, 205, 1895.

PROKOSHEV (S. M.) et ROMANOVA (K. A.). — Malonate block of respiration and interconversion of organic acids in plant tissue. *Doklady Akad. Nauk. SSSR.*, **106**, 508-10, 1956, C. A. **50**, 10197 *e*, 1956.

RABATE (J.) et GOUREVITCH (A.). — Note sur l'extraction des tartrates gauches

à partir des feuilles de *Bauhinia reticulata*. *J. Pharm. Chim.*, **1**, 524-5, 1941.

Ranjan (S.) et Rao. t. Roja. — Separation of organic acids by circular paper chromatography. Variations in the organic acids content in Pelargonium. *Naturwiss.*, **42**, 581, 1955.

Ribereau-Gayon (G.). — Sur l'évolution des anions organiques et des cations dans les organes de la vigne. *C. R. Ac. Sc.*, **248**, 3481-4, 1959 *a*.

Ribereau-Gayon (G.). — Sur la genèse des acides organiques dans la vigne. *C. R. Ac. Sc.*, **248**, 3606-9, 1959 *b*.

Ribereau-Gayon (J.). — Traité d'œnologie. Paris 1947.

Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — Analyse et contrôle des vins. Paris 1958.

Robinson (W. B.), Shaulis (N.), Smith (G. C.) et Tallman (D. F.). — Changes in the malic and tartaric acid contents of concord grapes. *Food Research*, **24**, 176-81, 1959.

Rodopoulo (A. K.). — Oxidation of tartaric acid in wine in the presence of salts of heavy metals. Activation of oxygen by iron. *Izvest. Akad. Nauk SSSR.* n° 3, 115-28, 1951. C. A. **46**, 4166 *i*, 1952.

Rodopoulo (A. K.). — Oxidation-reduction processes taking part in the production of wine. *Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR*, 12, n° 1, 21-4, 1952.

Rodopoulo (A. K.). — Chromatographie sur papier des acides di et tri carboxyliques du moût et du vin. *Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR.*, n° 8, 8-14, 1952.

Rodopoulo (A. K.). — Oxydase de l'acide dioxymaléique dans la vigne. *Biokimia vinodelia*, **5**, 199-211, 1957.

Rotini (O. T.), Dammann (E.) et Nord (F. F.). — Dehydrierungen durch *Fusarium lini* Bolley. *Biochem. Z.*, **288**, 414-20, 1936.

Sadataro Abe. — Metabolism of *Hemophilus pertussis*, I. Dehydrogenase system. *Japan J. Bacteriol.*, **7**, 67-70, 1952. C. A. **48**, 10115 *d*, 1954.

Sakaguchi (K.) et Tada (S.). — On the formation of succinic acid by *Bacterium succinicum*. nov. spec. *Zent. B. f. Bakt. II.*, **101**, 341-53, 1940.

Sallach (H. J.) et Peterson (T. H.). — Formation of hydroxyaspartic acid from dihydroxyfumaric acid and L glutamic acid. *J. Biol. Chem.*, 223, 629-34, 1956.

Schmalfuss (H.) et Barthmeyer (.). — 2-Butene-2,3 diol-1,4 dicarboxylic acid, the so-called « dihydroxymaleic acid ». *Z. Phys. Chem.*, **160**, 196-213, 1926. C. A. **21**, 569, 1927.

Schmalfuss (H.) et Keitel (K.). — Vorarbeiten für den Nachweiss von Säuren in Pflanzen. *Z. Physiol. Chem.*, **138**, 156-63, 1924.

Scholefield (P. G.). — Oxidation of malic and mesotartric acids in pigeon liver extracts. *Biochem. J.*, **59**, 177-9, 1955.

Shilo (M.). — The enzymic conversion of the tartaric acid to oxaloacetic acid. *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 472-81, 1957.

Shilo (M.) et Stanier (R. Y.). — The utilization of tartaric acid by *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.*, **17**, 482-90, 1957.

Shive (W.) et Macow (J.). — Some transformations involving aspartic acid. *J. Biol. Chem.*, **162**, 451-62, 1946.

Söhngen (N. L.). — Benzin, Petrolum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff und Energiequelle für Mikroben. *Zent. B. f. Bakt. II*, **37**, 595-609, 1913.

Stadtman (T. C.), Vaughn (R. H.) et Marsh (G. L.). — Decomposition of tartrates by some common fungi. *J. Bacteriol.*, **50**, 691-700, 1945.

Stafford (H. A.). — Tartaric acid dehydrogenase in higher plants. *Abstract Western Section Amer. Soc. Plant. Physiol. P.* 9. *Seattle Washington* June 1956 *a*.

Stafford (H. A.). — Dehydrogenase activity of hydroxymalonate and related acids in higher plants. *Plant. Physiol.*, **31**, 135-41, 1956.

STAFFORD (H. A.). — Tartaric acid dehydrogenase activity in higher plants. *Plant Physiol.*, **32**, 338-45, 1957.

STAFFORD (H. A.). — The distribution and possible metabolic origine of tartrate in angiosperms. *Proceedings of the Plant Physiology Meeting. Plant. Physiol. Supplement*, **33**, p. XXXIV, 1958.

STAFFORD (H. A.). — Distribution of tartaric acid in the leaves of certain angiosperms. *Am. J. of Botany*, **46**, 347-53, 1959.

STAFFORD (H. A.) et LOEWUS (F. A.). — The fixation of $C_{14}O_2$ into tartaric and malic acids of excised grape leaves. *Plant. Physiol.*, **33**, 194-99, 1958.

STAFFORD (H. A.), MAGALDI (A.) et VENNESLAND (B.). — The enzymatic reduction of hydroxypyruvic acid to D-glyceric acid in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **207**, 621-9, 1954.

STAFFORD (H. A.), MAGALDI (A.) et VENNESLAND (B.). — Enzymatic oxidation of DPN by diketosuccinate and dihydroxyfumarate. *Science*, **120**, 265-6, 1954.

SUMIKI (Y.). — Fermentation products of mold fungi. IV. *Aspergillus glaucus*. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **5**, 10-13, 1929. C. A. **24**, 3813, 1930.

SUMIKI (Y.) et YAITA (M.). — The utilization of chitin I Preparation of tartaric acid from glucosamine. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 723-26, 1943. C. A. **43**, 578 *d*, 1949.

SWEDIN (B.) et THEORELL (H.). — Dioximaleic acid oxidase action of peroxidases. *Nature*, **145**, 71-2, 1940.

SYMONS (G. E.) et BUSWELL (A. M.). — Methane fermentation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 2028-36, 1933.

TABACHNICK (J.) et VAUGHN (R. H.). — Characteristics of tartrate fermenting species of *Clostridium*. *J. Bacteriol.*, **56**, 435-43, 1948.

TAKAHASHI (T.), SAKAGUCHI (K. I.) et ASAI (T.). — Studies on acide formed by *Rhizopus* species 2. Formation of ethyl alcohol from tartaric and fumaric acids. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **2**, 16-23, 1926.

TAKEMOTO (T.) et KOIKE (H.). — Acid components of *Polyconum reynoutria*. *J. Pharm. Soc. Japan*, **73**, 100, 1953. C. A. **47**, 3933 f., 1953.

THIMANN (K.) et BONNER (W.). — Organic acid metabolism. *Ann. Review of Plant. Physiol.*, **1**, 75-108, 1950.

UNDERHILL (F. P.), LEONARD (C. S.), GROSS (E. G.) et JALESKI (T. C.). — Studies on the metabolism of tartrates. II The behaviour of tartrate in the organism of the rabbit, dog, rat and guinea pig. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, **43**, 359-80, 1931.

UNDERHILL (F. P.), PETERMAN (F. I.), JALESKI (T. C.) et LEONARD (C. S.). — Studies on the metabolism of tartrates in the human body. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, **43**, 381-98, 1931.

UNDERHILL (F. P.), PETERMAN (F. I.) et KRAUSE (A. G.). — Studies on the metabolism of tartrates I. A Colorimetric method for the detection of tartaric acid. *J. Pharmacol., and Exp. Therap.*, **43**, 351-8, 1931.

VAUGHN (R. H.) et MARSH (G. L.). — Bacterial decomposition of crude calcium tartrate during the process of recovery from grape residues. *J. Bacteriol.*, **45**, 35-36, 1943.

VAUGHN (R. H.), MARSH (G. L.), STADTMAN (T. C.) et CANTINO (B. C.). — Decomposition of tartrates by the coliform bacteria. *J. Bacteriol.*, **52**, 311-25, 1946.

VAVRUCH (I.). — Chromatography studies on sugar beet II Nitrogen free organic acids. *Chem. Listy.*, **48**, 442-5, 1954, C. A. **48**, 8567, 1954.

VICKERY (H. B.). — The metabolism of the organic acids of tobacco leaves. XIV. On the uptake of (+) tartaric acid from solutions in the range pH 3 to pH 6. *J. Biol. Chem.*, **227**, 943-9, 1957.

VICKERY (H. B.) et PALMER (J. K.). — The metabolism of the organic acids

of tobacco leaves VII. Effect of culture of excised leaves in solutions of (+) tartrate. *J. Biol. Chem.*, **207**, 275-85, 1954.

VISSER'T HOOFT. — Biochemische onder zoekingen over het geslacht *Acetobaçter*. *Thèse Delft.*, 1925.

WALKER (T. K.) et WILES (A. E.). — Asporogenous film forming yeast occuring as contaminants of brewery yeasts and beers. *J. Inst. Brew.*, **58**, 140-7, 1952.

WATANABE (H.) et TAKANO (T.). — Components of *Digenea simplex*. *J. Pharm. Soc. Japan.*, **73**, 529-30, 1953. C. A. 48, 3259 *b*, 1954.

WIELAND (H.) et FRANKE (W.). — Die Aktievierung des Sauerstoffs durch Eisen. *Liebig Ann.*, **464**, 101-226, 1928.

WILLAMAN (J. J.), WEST (B. M.) et HOLM (G. E.). — Note on the composition of the sorghum plant. *J. Agric. Res.*, **18**, 1-33, 1919.

WOHL (A.) et OESTERLIN (C.). — Ueberführung der Weinsäure in Oxalessigsäure durch Wasserabspaltung bei niederer Temperatur. *Ber.*, **34**, 1139-48, 1901.

WONG (D. T. O.) et AJL (S. J.). — Conversion of acetate and glyoxylate to malate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 3230-1, 1956.

ZAAKE (S.). — Das Verhalten hefeartiger Pilze gegenüber Weinsäure. *Zent. B. f., Bakt. II.*, **111**, 410-39, 1958.

ZELITCH (I.). — Oxidations and reduction of glycolic and glyoxylic acid in plants. *J. Biol. Chem.*, **201**, 719-26, 1953.

ZELITCH (I.) et OCHOA (S.). — Glycolic acid oxidase. *J. Biol. Chem.*, **201**, 707-19, 1953.

CHRONIQUE DES LIVRES

PASCAL RIBEREAU-GAYON. — **Recherches sur les anthocyannes des végétaux, applications au genre *vitis*.** — Thèse. — Librairie générale de l'enseignement, 4, rue Dante, Paris 1959.

La première partie de ce travail est consacrée aux propriétés générales des anthocyannes. Les résultats portent essentiellement sur la spectroscopie dans le visible et l'ultraviolet, la structure des anthocyannes en fonction du pH et la décoloration de ces substances par l'acide sulfureux et les réactifs de la fonction cétone.

La deuxième partie décrit les méthodes permettant la séparation et l'identification de tous les pigments anthocyaniques d'un échantillon ; celles-ci ont été mises au point à partir du raisin mais pourraient être étendues à n'importe quel autre matériel végétal. Ces méthodes comprennent d'abord la séparation des différents pigments à l'aide d'une technique personnelle de chromatographie à deux dimensions dont les résultats sont intéressants parce qu'il existe une relation entre l'emplacement d'un pigment sur un tel chromatogramme et sa structure chimique. On effectue ensuite un fractionnement systématique des différents pigments par chromatographies successives sur plusieurs feuilles de papier épais ; on obtient ainsi les différents pigments à l'état pur et on en effectue l'identification par voie chimique. Pour donner aux résultats de la chromatographie une expression quantitative, les bandes chromatographiques à une dimension sont enregistrées par photométrie.

La troisième partie est une application des méthodes précédentes à l'étude des différentes espèces du genre *Vitis*. Les résultats obtenus constituent la première application de la chromatographie sur papier à l'étude de ce problème ; aussi ils modifient de façon importante nos connaissances sur ce sujet. La confrontation des résultats avec ceux précédemment admis montre que la nature de la matière colorante des raisins est beaucoup plus complexe qu'on ne pouvait le supposer, autant par le nombre de pigments (jusqu'à 17) que par leur nature ; en particulier il est montré que la présence dans le raisin d'anthocyanosides de la famille du cyanidol et d'anthocyanosides acylés est tout à fait générale ; par contre on ne trouve jamais à l'état libre d'aglycones, ou anthocyanidols.

Cette étude porte sur l'ensemble des espèces du genre *Vitis*, et non sur un échantillon particulier de raisin ; aussi permet-elle de saisir des différences chimiques très nettes entre les espèces. Les résultats font ressortir, pour les raisins, deux types principaux de matière colorante correspondant à la présence de diglucosides anthocyaniques (*V. riparia* et *V. rupestris*) ou à leur absence (*V. vinifera*) ; d'autre part des exemples précis ont montré que le caractère « diglucosides » se transmet au cours des hybridations par le mode dominant.

On voit donc tout l'intérêt de la connaissance des anthocyannes pour l'étude des cépages et leur classification.

Ce travail envisage enfin l'influence sur la matière colorante de différents facteurs : variété, état de maturation, milieu, facteurs climatiques.

ADVENIER. — **Contribution à l'étude des relations entre la composition et la valeur boulangère des farines de blé.** — Thèse, Gomes, Ed., Toulouse (1960).

Dans cette étude, l'auteur essaie de montrer en quelle mesure la qualité boulangère des farines peut être reliée à leur composition en constituants protéiques et lipidiques.

Son matériel expérimental comprend 16 farines de type commercial à différents taux d'extraction, dont 6 proviennent de variétés pures. Leur valeur boulangère, déterminée à l'alvéographe Chopin (il s'agit en fait de force boulangère) représente une gamme de W allant de 47 à 239.

I. — C'est principalement à l'étude du *matériel* protidique des farines que ce travail est consacré.

Le *fractionnement* mis en œuvre est simple : le gluten (protéines insolubles) est extrait par lixivation à l'eau. Les protéines solubles sont recueillies avec l'amidon dans les eaux de lavage.

Celles-ci sont soumises à une dialyse qui permet de séparer les constituants azotés dialysables de ceux qui, mélangés à l'amidon, ne dialysent pas.

Le dialysat contient entre 2,4 et 5,7 p. 100 de l'N total de la farine ; l'adialysat entre 6 et 24 p. 100.

Le gluten est traité par l'éthanol 65° (à 22°C et pH 6) pour en extraire la gliadine ; la gluténine est isolée du résidu par la soude 0,1 N.

Exprimé par rapport à l'azote de la farine, l'N de la gliadine varie de 14,3 à 34, 5 p. 100, celui de la gluténine de 48, 8 à 70,2 p. 100.

En considérant les résultats obtenus sur 11 échantillons, l'auteur établit qu'il existe une corrélation positive entre la force boulangère et la teneur en azote de la farine d'une part ($\rho = + 0{,}806$), la teneur en azote de la gluténine d'autre part ($\rho = + 0{,}797$). Il n'apparaît aucune corrélation entre la valeur boulangère et les substances azotées libres.

La *composition en acides aminés* des fractions azotées solubles (dialysables et non dialysables) et insolubles (gliadine et gluténine) a été déterminée, après hydrolyse et purification des hydrolysats sur résine (permutite 50), en conjuguant l'électrophorèse et la chromatographie bidimensionnelle sur papier.

Le schéma expérimental est le suivant :

Le traitement électrophorétique des hydrolysats purifiés permet de séparer les acides aminés en 2 groupes : neutres et diaminés et individuellement les acides aspartique et glutamique.

Après élution des taches correspondantes à l'aide d'un dispositif décrit en détails, les acides aminés neutres et basiques sont séparés individuellement par électrophorèse et chromatographie.

La détermination quantitative des acides aminés s'effectue par immersion des chromatogrammes dans une solution de ninhydrine tamponnée à pH 7,

révélation des taches par passage 30 minutes dans l'étuve à 50°C et mesure au spectrophotomètre de la coloration éluée.

Les *constituants azotés solubles* du dialysat et de l'adialysat n'ont été étudiés que qualitativement.

L'étude du *dialysat* non hydrolysé a mis en évidence, outre un nombre élevé de peptides, la présence, à côté des acides aminés courants, de β-alamine, d'acide γ amino-butyrique, d'acide cystéique et d'éthanolamine. L'auteur admet que la plus grande partie des acides aminés du dialysat résulte d'une hydrolyse des peptides par l'eau.

L'étude avant hydrolyse de la fraction *non dialysable*, qui contient les protéines type albumine-globuline en présence d'un grand excès d'amidon, s'est avérée très complexe et n'a pas révélé de différences marquées entre les farines.

Les quantités d'azote retrouvées à l'état d'acides aminés après hydrolyse ne représentent que 60 p. 100 de l'azote initial. L'auteur constate que la proportion des protéines retenues dans l'amidon est constante et admet l'existence de composés relativement stables résultant de l'interaction protéines-amidon.

La composition en acides aminés des *protéines insolubles* du gluten a été étudiée quantitativement.

L'azote de la gluténine et de la gliadine, retrouvé à l'état d'acides aminés après hydrolyse, représente respectivement 90 et 80 p. 100 de l'azote de chaque fraction.

Trois acides aminés : acide glutamique, proline et leucine dominent quantitativement dans le gluten : ils constituent environ la moitié du total des acides aminés.

Contrairement aux travaux antérieurs de PENCE, l'auteur met en évidence certaines relations entre la composition des glutens en certains acides aminés et la valeur boulangère des farines exprimée par le W Chopin.

Il montre l'existence d'une corrélation positive entre cette valeur boulangère et la teneur en proline de la gluténine ($\rho = + 0{,}766$) et de la gliadine ($\rho = 0{,}746$).

Il considère également comme probable une corrélation positive entre la valeur boulangère et les concentrations des autres *acides aminés cycliques*. La proportion de phénylalamine en particulier semble être plus élevée dans les farines fortes.

Selon lui, l'accroissement de la teneur en acides aminés cycliques correspondrait à un raccourcissement des chaînes protéiques et celui-ci à une augmentation de la ténacité du gluten. La proline, par son importance quantitative, accentuerait le phénomène de raccourcissement des chaînes.

L'auteur constate inversement une corrélation négative entre le W et la teneur en *acides aminés* possédant des *groupements* — OH (sérine, thréonine, tyrosine). Le *coefficient de corrélation* est de — 0,657 pour la gliadine, — 0,824 pour la gluténine.

L'explication qu'il en donne est la suivante : l'influence négative des groupements — OH sur la force boulangère ne serait pas reliée à la structure des molécules protéiques mais à leur constitution chimique : une teneur élevée en groupements —OH accroîtrait la capacité réductrice des protéines et serait défavorable aux propriétés mécaniques du gluten.

Il n'existe aucune relation entre la force boulangère et les proportions des autres acides aminés neutres et des diacides. Quant aux acides aminés basiques, leur proportion semble croître avec le W.

Enfin, en raison de l'imprécision des déterminations, le rôle éventuel des acides aminés soufrés n'a pas été envisagé.

II. — La seconde partie de cette étude, consacrée aux *constituants lipidiques* des farines, se révèle plus succincte.

Sur les lipides isolés des farines, après extraction au butanol saturé d'eau et reprise par le chloroforme, l'auteur a déterminé l'indice d'iode ainsi que les teneurs en Phospore et Potassium.

Les résultats obtenus montrent que :

— la teneur des farines en lipides totaux ne présente pas de relation avec leur force boulangère ;

— l'indice d'iode décroît lorsque le W augmente, ce qui, selon l'auteur, revient à dire que la farine est d'autant plus forte que ses lipides sont plus oxydés ;

— la teneur en phosphore (donc en phospholipides) augmente avec l'indice alvéographique ;

— le rapport P/K est le plus souvent plus faible dans les farines à W élevé. Considérant que le K est susceptible de saturer la fonction acide libre du PO_4H_3 constituant des lécithines, l'auteur admet que la valeur boulangère d'une farine est d'autant plus élevée que la saturation de cette fonction acide est plus importante.

Il est indéniable que l'étude présentée par l'auteur repose sur un ensemble de techniques analytiques sérieuses et éprouvées qui ont été conduites avec soin.

Les hypothèses qu'il tire de son expérimentation sont séduisantes, mais néanmoins fragiles. On peut en effet lui objecter que les conclusions auxquelles il aboutit en s'aidant du calcul statistique ne s'appuient pas sur un nombre de résultats expérimentaux suffisamment important.

Etendue à un plus grand nombre d'échantillons, une telle étude eût sans doute permis de préciser de façon moins hypothétique le rôle infiniment complexe des constituants des farines vis-à-vis de leur qualité technologique.

Le Directeur-Gérant ; B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 6-9-1960.
Dépôt légal : 3e trimestre 1960 *N° d'impression : 83*

LE PLOMB DANS LES MOUTS ET LES VINS

PAR

P. Jaulmes, Mlle G. Hamelle et Mme J. Roques.

Laboratoire de Chimie analytique et Toxicologie,
Faculté de Pharmacie, Montpellier

Les auteurs appliquent une méthode personnelle de dosage colorimétrique à base de dithizone, dosant le plomb dans des moûts et des vins des différentes régions viticoles françaises. C'est la première partie de leur mémoire.

Dans une 2e partie ils recherchent les causes d'enrichissement en plomb. Ils étudient ainsi systématiquement tous les matériaux et tous les produits utilisés en œnologie. Ils se préoccupent même de la terre et des poussières.

Ils aboutissent ainsi à fixer une dose « normale de plomb » tolérable. Ils donnent ensuite des données générales pour éviter tout enrichissement excessif en plomb.

Ce mémoire est une contribution fondamentale au problème du plomb dans les vins et les moûts.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Travaux antérieurs ; intérêt pratique de l'étude.

II. — Méthodes de dosages.

Méthode officielle anglaise, suivie par Brémond et Roubert.
Méthode suivie par Rankine.
Méthodes de Bonastre et de Snyder-Truffert.
Méthode de réversion de Irving et Butler.
Méthode de Gilbert et Grohmann.
Méthode Jaulmes et collaborateurs,
Comparaison de cette méthode avec la méthode officielle anglaise.

III. — Résultat des déterminations.

Moûts et vins d'Alsace.
Vins d'Anjou.
Moûts et vins du Bordelais.
Vins de Bourgogne.

Vins de Champagne.
Moûts de la Loire.
Moûts et vins du Midi.
Moûts et vins du Poitou.
Vins doux naturels du Roussillon.
Vins de liqueurs, vermouths et quinquinas divers.
Alcools et spiritueux.
Comparaison avec les résultats des autres auteurs, présence normale du plomb dans les moûts et les vins.

IV. — Causes d'apport de plomb aux vins.

1° Traitement du vignoble à l'arséniate de plomb, action de la fermentation et du vieillissement du vin.
2° Poussières et terres.
3° Cuves de fermentation et de conservation des vins.
4° Métal des robinets, pompes, tuyaux etc...
5° Soudures et étamages.
6° Tuyaux de caoutchouc et objets de matières plastiques.
7° Mastics et luts.
8° Émaux, enduits et peintures.
9° Bouteilles.
10° Produits œnologiques.
11° Capsules de surbouchage.

V. — Dose maxima de plomb tolérable.

VI. — Conclusions.

I. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

Malgré les travaux de G. Bertrand et V. Ciurea (11) et Kehoe (12) et de bien d'autres qui ont montré il y a une trentaine d'années la présence constante de quantités minimes de plomb chez tous les êtres vivants, peu de chimistes ou de biologistes se sont préoccupés de déceler la présence ou de déterminer la quantité de plomb contenue dans les vins. Sans remonter au moyen âge et aux coliques du Poitou, dues à la désacidification du vin avec de la litharge — pratique étonnante depuis longtemps disparue, et à part les rares cas de pollution accidentelle massive, le vin n'a pas été signalé par les médecins comme ayant provoqué des accidents de saturnisme, aussi les hygiénistes s'étaient-ils peu préoccupés de cette présence dans les vins. Cette rareté des travaux sur la présence de ce métal dans les vins vient aussi du fait que le dosage du plomb est difficile lorsqu'on recherche des traces de ce métal. La difficulté vient surtout du fait de la très grande diffusion de cet élément dans les produits chimiques et dans les objets usuels si bien que les poussières de l'air en contiennent toujours des quantités notables.

En 1939, BOLOTOV (1) a trouvé que 44 des 48 vins du commerce qu'il a analysés contenaient de 0,24 à 0,90 mg de plomb par litre. Dans les vins préparés dans son laboratoire il n'a trouvé que 0,06 à 0,10 mg de plomb par litre.

DE ALMEIDA (2) ayant examiné en 1947, 54 portos a trouvé des quantités de plomb ainsi distribuées :

Traces de plomb	32 %
Moins de 1 mg p. litre	32,5 %
De 1 à 2 mg	20,5 %
De 2 à 2,6 mg	15 %

Dans 7 vins de liqueur étrangers cet auteur a trouvé de 1,8 à 3,5 mg de plomb par litre.

MONIER-WILLIAMS (3) estime que les vins en contiennent généralement moins de 1 mg par litre et que ce n'est que par accident qu'il a pu trouver 7 à 12 mg de plomb par litre. Il rappelle que le plomb est en grande partie précipité pendant la fermentation ou pendant la période de stockage.

L'un de nous s'est préoccupé du dosage du plomb dans les vins dès 1941. Les résultats obtenus ont été publiés tardivement dans deux articles parus en 1948 (4). Un de ces articles a été écrit en collaboration avec M. FERRE (5). On trouve le détail de ces résultats dans la thèse de Mlle ACHARD (6) et un résumé dans l'ouvrage de l'un de nous (7).

Tels sont les travaux les plus récents parus avant 1950. Ils indiquaient la présence constante de petites quantités de plomb n'exposant généralement pas la santé des consommateurs à un danger appréciable. Seul M. de ALMEIDA avait signalé des teneurs en plomb nettement supérieures à 1 mg par litre dont la nocivité ne pouvait être méconnue.

Or en décembre 1952, le Ministry of Food de Grande-Bretagne a fait connaître que des limites maxima sur la teneur en plomb des boissons et aliments allaient prochainement être fixées dans ce pays suivant l'avis du Comité des Normes alimentaires, Sous-Comité de la Contamination métallique. Pour les vins la limite maxima proposée de 0,2 p.p.m. apparaissant faible, une certaine inquiétude s'est manifestée chez les importateurs anglais ainsi que chez les producteurs français, italiens, portugais, etc... De nouveaux travaux ont alors été entrepris sur ce sujet dont l'intérêt pratique était ainsi fortement accru.

L'Association des Viticulteurs champenois s'est préoccupée de cette question dès 1953. Avec la collaboration de MM. FRANÇOT et GEOFFROY de la Station œnologique d'Épernay nous avons repris cette étude.

En 1955 l'Institut National de la Recherche Agronomique nous a confié l'étude générale de la teneur des vins français en cet élément indésirable et diverses stations œnologiques nous ont envoyé de nombreux échantillons de moûts et de vins prélevés dans des conditions précises d'origine et de pureté.

Nous présentons ici les résultats de nos déterminations qui nous ont occupés 5 années, une partie de celles-ci ont été présentées en novembre 1956 au Congrès de Chimie Industrielle de Paris, section matières alimentaires, mais le Mémoire n'a pas été imprimé.

Entre temps M. RANKINE (9) a publié une intéressante note en 1955 sur la teneur en plomb de 55 vins australiens. Il a trouvé de 0,04 à 0,86 mg de plomb par litre avec une moyenne de 0,23 mg. Plus récemment M. RANKINE (10) a fait paraître une très importante étude sur les causes d'apports de plomb dans les moûts et les vins ; son étude sera souvent citée plus loin.

En juillet 1956, au Congrès de l'Association Française pour l'avancement des Sciences qui s'est réuni à Dijon, MM. BREMOND et ROUBERT (10) ont présenté les résultats de leur étude de la teneur en plomb des moûts et vins d'Algérie. Ces auteurs ont trouvé dans 48 moûts une quantité de plomb comprise entre 0,020 et 0,810 mg de plomb par litre avec une teneur moyenne de 0,171 mg par litre. Dans 67 vins les quantités trouvées se situent entre 0,020 et 1,780 mg/litre avec une teneur moyenne de 0,245.

En 1958 M. TARANTOLA (13) a trouvé dans 29 vins italiens des quantités de plomb toujours inférieures à 0,7 mg par litre et le plus souvent comprises entre 0,05 et 0,2.

Enfin tout dernièrement MM. GILBERT et GROHMANN (14) ont étudié par une méthode polarographique la teneur des moûts et vins en plomb. Sur 18 échantillons seulement, ils ont trouvé des teneurs inférieures à 0,17 mg/l.

Plus récemment encore (19-20 mai 1960) s'est tenue à Paris la deuxième réunion de la sous-commission d'unification des méthodes d'analyses et d'appréciation des vins. Au cours de cette réunion M. CINCINNATO DA COSTA a signalé que de récentes déterminations du plomb dans les vins du Portugal, ont été effectuées par M. NUNEZ SALVADOR, Mlle FERREIRA ALVEZ et M. MENDES VASCONCELOS. La répartition centésimale suivante a été observée :

	Nombre d'échantillons	0 à 0,10	0,11 à 0,20	0,21 à 0,30	0,31 à 0,40
		Milligrammes de plomb par litre de vin.			
Vins rouges.....	60	73,5	10	8,3	8,2
Vins blancs.....	20	55	20	15	4
Vins de Madère...	23	21,7	43,5	30,4	4,4
Eaux-de-vie 76°-78°	20	100			
Alcools à 95°.....	10	100			

M. GAROGLIO a signalé qu'en Italie, où la teneur des vins en plomb est surveillée régulièrement, il a pu trouver jusqu'à 0,7 mg de plomb par litre dans les vins de son pays.

Ces travaux portant sur des vins d'origines différentes de ceux que nous avons nous-mêmes étudiés n'enlèvent nullement l'intérêt de nos propres recherches, bien plus ils nous permettent de présenter un très instructif tableau d'ensemble des vins d'origines très diverses.

Tous ces auteurs et nous-mêmes n'avons pas utilisé la même méthode de dosage ; il importe donc tout d'abord d'indiquer quelles ont été ces méthodes et de rapporter les quelques résultats de contrôle réciproque et de comparaison qui ont été faits.

II. — MÉTHODES DE DOSAGE

La plupart des auteurs qui ont dosé le plomb dans les vins ont employé la méthode à la dithizone, réactif proposé en 1934 par Helmut Fischer (15) pour le dosage d'un grand nombre de métaux lourds.

Les techniques proposées sont généralement basées sur la suite d'opérations ci-après : la destruction de la matière organique par la méthode azotosulfurique, avec éventuellement emploi de l'acide perchlorique qui brûle plus facilement la matière organique que l'acide nitrique parce qu'il est moins volatil et moins stable. On ajoute ensuite du citrate d'ammonium pour éviter la précipitation des phosphates tricalcique, ammoniaco-magnésien, ferrique et aluminique. On ajoute également de l'hydroxylamine pour réduire le fer qui à l'état trivalent en milieu alcalin et en présence de cyanure oxyderait la dithizone et du cyanure de potassium pour complexer le cuivre, le fer II, etc... Il faut d'allleurs éviter un trop grand excès de cyanure de potassium qui retiendrait le plomb dans la phase aqueuse. D'une manière générale les métaux pouvant troubler le dosage sont le bismuth et le thallium, mais ces deux métaux n'existent pas dans le vin à part une pollution exceptionnelle improbable, il n'y a donc pas lieu de s'en préoccuper, d'autant plus que ces métaux étant au moins aussi toxiques que le plomb, leur confusion avec ce toxique n'aurait pas d'inconvénient pratique.

Tous les auteurs ont insisté sur la nécessité de la purification des réactifs et de l'utilité d'un essai à blanc. Ils utilisent en général 50 ml de vin, leur méthode étant capable de déceler de 1 à 40 microgrammes de plomb.

MM. Bremond et Roubert ont employé la méthode officielle anglaise de 1954, technique simplifiée applicable aux produits exempts de bismuth, étain et pauvres en acide phosphorique. Cette technique anglaise de 1954 (16) a été modifiée en 1959 (17), postérieurement aux travaux de Bremond et Roubert par addition d'hexamétaphosphate de sodium pour éviter la précipitation du phosphate tricalcique ou du phosphate ammoniaco-magnésien.

Voici la technique suivie par MM. BREMOND et ROUBERT :

50 ml de vin sont détruits par la méthode azoto-perchloro-sulfurique, on emploie 2 ml d'acide sulfurique, 1 ml d'acide perchlorique à 60 p. 100 et une quantité suffisante d'acide nitrique. Le liquide de destruction est repris par 10 ml d'eau et 5 ml d'acide chlorhydrique 5 N, on fait bouillir pour détruire le reste éventuel d'oxydants : acides perchlorique et nitrique. On ajoute 2 ml de métabisulfite de sodium à 5/1000, 2 ml de citrate d'ammonium à 25 p. 100. On neutralise par l'ammoniaque 5 N en présence de 2 gouttes de bleu de bromothymol. On ajoute 1 ml de cyanure de potassium à 10 p. 100 et dilue à 40 ml. Cette solution introduite dans une ampoule à décantation est additionnée de 10 ml de chloroforme, de 10 ml d'ammoniaque 5 N et d'une solution aqueuse alcaline de dithizone en quantité suffisante pour qu'après agitation la couche chloroformique passe du rouge au violet, ce qui est l'indice de la présence d'un petit excès de dithizone.

La couche chloroformique est alors lavée dans une autre ampoule avec une solution de cyanure de potassium à 5 p. 1 000 qui enlève l'excès de dithizone et les éventuelles traces de cuivre ou de fer qui auraient pu passer dans le chloroforme. On décante soigneusement cette solution, on la filtre pour la déshydrater et l'on compare au spectrophotomètre sous une épaisseur de 1 cm et avec la radiation verte de 520 millimus cette solution rouge de dithizonate de plomb, avec des solutions contenant 0-10-20-30-40 millièmes de milligramme de plomb et obtenues par la même suite de manipulations et avec les mêmes quantités de réactifs.

Les réactifs utilisés dans cette méthode sont préalablement débarrassés de plomb par distillation (pour les acides et l'ammoniaque) ou par extraction à la dithizone et le chloroforme pour les solutions pouvant être amenées à pH 9,5-10. Ces réactifs sont conservés en flacons de pyrex préalablement lavés à l'acide nitrique dilué bouillant, comme toute la verrerie utilisée.

M. RANKINE a utilisé une méthode analogue qui en diffère par quelques détails qu'il est intéressant de noter. Après évaporation de 50 ml de vin dans une fiole de Kjeldahl on détruit la matière organique par l'acide nitrique en présence de 3 ml d'acide sulfurique. Après dilution à 25 ml, on ajoute 10 ml de citrate d'ammonium à 50 g pour 100 ml, 1 ml de chlorhydrate d'hydroxylamine à 20 g pour 100 ml, 2 gouttes de bleu de thymol à 2 pour mille et de l'ammoniaque en quantité suffisante pour que le réactif soit sous sa forme jaune. On ajoute alors 5 ml de cyanure de potassium à 10 g pour 100 ml et amène le pH à 8,5-9 par de l'ammoniaque, le bleu de thymol vire alors au bleu. On extrait alors le plomb par le chloroforme et la dithizone comme le faisaient MM. BREMOND et ROUBERT en suivant la technique officielle anglaise.

La solution chloroformique de dithizonate de plomb est ensuite traitée par 25 ml d'acide nitrique à 1 ml p. 100 ml qui extrait le plomb. On emploie alors seulement 5 ml de cette liqueur (ou 10 ml pour les produits relativement pauvres en plomb tels que les raisins). Pour le dosage colorimétrique, on ajoute à cette prise d'essai 5 ml d'une solution ammoniacale de cyanure de potassium (4 g de cyanure de potassium, 150 ml d'ammoniaque concentré par litre). Cette solution doit être préparée depuis quelques jours. On ajoute 5 ml de solution chloroformique de dithizone à 1 g par litre et agite. On mesure la transmission de la radiation verte 510 millimus de la solution chloroformique en la comparant à la transmission de solutions types préparées avec 0-1-2-3-4-5 microgrammes de plomb. Un essai à blanc doit toujours être effectué avec les mêmes réactifs employés en même quantité que dans l'essai du vin. Cet essai à blanc a généralement manifesté la présence de 0,2 à 0,4 microgramme de plomb dans les réactifs.

M. RANKINE a toujours choisi des réactifs très purs ou il les a purifiés lui-même suivant les techniques qu'il a minutieusement décrites.

Les méthodes de M. BONASTRE (18), de MM. SNYDER et TRUFFERT (19) consistent à extraire le plomb du liquide de destruction nitrosulfurique par la dithizone en solution chloroformique puis à extraire ce plomb par l'acide chlorhydrique à pH 2,5 (BONASTRE) ou par l'acide nitrique à 1 p. 100 (SNYDER, TRUFFERT). On recombine ensuite le plomb à la dithizone dans des conditions standard pour assurer un dosage colorimétrique de dithizonate de plomb. Ces auteurs ont observé que le dosage n'est pas valable sur la solution chloroformique ayant extrait le plomb du milieu complexe provenant de la destruction sulfo-nitrique.

La méthode d'IRVING et BUTLER (20) est basée sur le même principe, mais la lecture colorimétrique est particulière. C'est une technique dite de réversion qui consiste après avoir mesuré la densité optique à 623 millimus (lumière rouge) où l'on mesure seulement la dithizone libre à laver la phase tétrachlorocarbonique à l'aide d'une eau nitrique à 0,25 par litre ou sulfurique à 1 p. 100 (selon PORRETTA, CAPUANO, CULTRERA) (21) pour n'enlever que le plomb à sa combinaison dithizonique. On mesure la nouvelle densité optique qui a augmenté de la quantité de dithizone libérée de sa combinaison plombique. On tient compte ainsi et l'on corrige le dosage des perturbations apportées par le bismuth et le thallium éventuellement présents et les impuretés de la dithizone.

D'autres auteurs ont préféré doser le plomb par polarographie. Malheureusement le fer gêne beaucoup le dosage du plomb parce que le potentiel d'oxydoréduction du fer trivalent est très voisin de celui de l'ion plomb. BONASTRE et POINTEAU (22) séparent préalablement le plomb, le zinc et le cuivre par la dithizone à pH 9,5. Ils extraient ensuite

le plomb et le zinc par l'acide chlorhydrique demi-normal. La solution aqueuse plombo-zincique est additionnée d'acétate et de thiocyanate d'ammonium amené au pH 4,6 et on effectue le dosage polarographique sur cette solution.

MM. GILBERT et GROHMANN (14) utilisent tout dernièrement la polarographie sur les cendres de 50 ml de vin, dissoutes dans l'acide chlorhydrique, additionnées de chlorure de lithium, de gélatine, et de ferrocyanure de potassium en excès suffisant pour précipiter le fer, le cuivre et le zinc, sans précipiter le plomb ; le ferrocyanure de plomb est le plus soluble de tous les ferrocyanures de métaux lourds (23). Cette méthode, toute nouvelle, n'a pu encore être essayée dans notre laboratoire.

Pour notre part nous avons employé une méthode utilisant la dithizone, conçue en 1940 par l'un de nous (24) et publiée après une longue mise au point, de nombreuses vérifications et quelques améliorations, en collaboration avec Mlle ACHARD (4-6) et par deux d'entre nous (25). Cette méthode a été adoptée comme méthode officielle en Italie, il y a peu de temps, après y avoir été contrôlée.

Cette méthode est basée sur deux principes directeurs :

1° Pour éviter toute gêne due à l'ion phosphorique, au fer III et au zinc (éventuellement au thallium), nous avons précipité le plomb par l'hydrogène sulfuré en l'entraînant dans un précipité de sulfure de mercure, sulfure dont il est facile de se débarrasser grâce à sa volatilité après action de l'eau régale qui le transforme en chlorure mercurique très volatil.

2° Pour avoir des réactifs exempts de plomb nous les avons tous obtenus par distillation. Ils ont donc été tous choisis distillables.

MODE OPÉRATOIRE. — La destruction de la matière organique est obtenue par la méthode azoto-sulfurique en ballons de quartz transparent avec 1 millilitre d'acide sulfurique au plus. On utilise 20 ml de vin, on évapore l'alcool, ajoute 5 ml d'acide nitrique et on chauffe en ajoutant NO_3H par petites quantités. La destruction dure généralement 1 heure seulement, mais 2 heures dans le cas des vins doux.

Le liquide de destruction est dilué à 10 ml environ, on le neutralise presque complètement par l'ammoniaque et on ajoute 2 à 4 gouttes d'acide chlorhydrique pur au demi. Il faut que le pH soit inférieur à 1,8. Le phosphate plombique précipite à partir de 1,8, le phosphate ferrique à partir du pH 2,5. La liqueur doit être limpide. Cette neutralisation partielle est indispensable, sinon le sulfure de plomb ne précipitera pas. On ajoute alors 0,2 ml de solution saturée de bichlorure de mercure pur R. P. (Ce produit est exempt de plomb (1)). On place le prélèvement

(1) Il pourrait être purifié par sublimation si cela était nécessaire.

dans un tube à centrifuger et on sature d'hydrogène sulfuré, ce réactif étant purifié par filtration et trois lavages. On centrifuge en tube fermé, on lave deux fois le précipité avec de l'eau saturée d'hydrogène sulfuré et on le redissout dans 0,6 ml d'acide chlorhydrique et 0,4 ml d'acide nitrique. On transvase le liquide à la pipette dans une capsule de silice. Ce lavage par les acides est refait trois fois en chauffant pour activer la dissolution des sulfures.

Tant que nous avons utilisé des capsules de silice translucide nous avons eu de nombreux déboires, parce que ces capsules deviennent poreuses dès que la couche superficielle brillante a disparu. Les capsules en silice transparente que l'on trouve maintenant dans le commerce ont évité dorénavant ces difficultés.

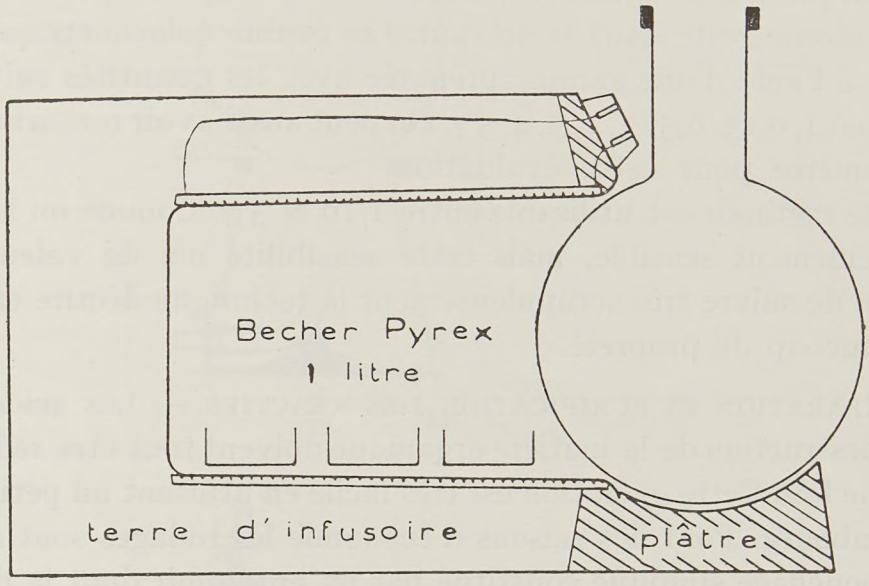


FIG. 1.

Ces capsules sont alors placées dans un four à 120°, constitué par un bécher de Pyrex chauffé électriquement et placé horizontalement (*fig.* 1). Lorsque le liquide est volatilisé on place les capsules dans un autre four à 450 degrés où on les laisse une demi-heure, le chlorure de mercure est volatilisé. On reprend par quelques gouttes d'acide chlorhydrique et on recommence les deux évaporations de manière à transformer tout le mercure en bichlorure volatil. On reprend alors la capsule par quelques gouttes d'acide nitrique, évapore à 120 degrés et reprend par 2 ml d'A. C. N. S., tiédit, transvase dans un tube à essai ; cette opération est répétée trois fois. On a ainsi tout le plomb, séparé du fer et de l'acide phosphorique qui troublerait gravement l'extraction à la dithizone. Ce procédé de séparation par l'hydrogène sulfuré peut paraître un peu vieillot. Il entraîne une certaine complication, mais il donne une grande sécurité et il évite l'emploi des réducteurs et du citrate pour complexer le fer, produits qu'il faut préalablement débarrasser de plomb par la dithizone.

La suite des opérations ne présente pas grande difficulté et elle est tout à fait banale, elle se fait dans un tube à essai bouché émeri en Pyrex, dans lequel on place les 6 ml de liqueur d'A. C. N. S. qui ont dissout le plomb, 1 ml de tétrachlorure de carbone et 10 à 20 gouttes de solution de dithizone aqueuse. On agite, la phase chlorocarbonique doit être verte ou violette ; si elle est rouge il faut ajouter un peu plus de dithizone et de tétrachlorure de carbone, il y a alors plus de 5 γ de plomb. On rejette la phase aqueuse et fait un lavage à l'eau pure et deux lavages avec de l'A. C. N. S. dilué au 1/50. Au pH 9,5 de cette liqueur, la dithizone libre est extraite par l'eau tandis que la dithizone plombique reste dans le tétrachlorure de carbone. Le tétrachlorure de carbone est alors incolore, rose ou rouge, suivant la teneur en plomb. On ajoute alors 5 gouttes d'acide chlorhydrique 2N. Le plomb est arraché à la dithizone à pH inférieur à 1, et la dithizone reste dans le solvant. On évalue colorimétriquement sa quantité à l'aide d'une gamme préparée avec les quantités suivantes de plomb : 0,0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 γ. On peut aussi avoir recours à un spectrophotomètre pour cette évaluation.

Cette méthode est utilisable entre 1/10 et 5 γ. Comme on le voit elle est extrêmement sensible, mais cette sensibilité n'a de valeur qu'à la condition de suivre très scrupuleusement la technique décrite et d'opérer avec beaucoup de propreté.

Préparation et purification des réactifs. — Les acides utilisés dans la destruction de la matière organique doivent tous être redistillés au moins une fois. Cette opération est très facile en utilisant un petit appareil de Ladenbourg. Pour des raisons d'économie les rodages sont remplacés par un bouchage simplifié constitué par un entonnoir dont la douille est soudée et qui réalise une obturation parfaite dès qu'il est rempli d'un liquide grâce auquel quelques gouttes se condensent et forment joint hydraulique entre le col du ballon et ce bouchon improvisé (*fig.* 2). Ce dispositif est fort commode. Il a l'avantage d'éviter tout éclatement du ballon en cas de retard d'ébullition.

On distille dans cet appareil les acides nitrique, chlorhydrique, acétique.

Pour l'acide *nitrique*, on peut partir de l'acide nitrique ordinaire, mais il faut le distiller deux fois, ou bien on distille une seule fois l'acide nitrique pur. L'acide nitrique pur contient 50 γ de plomb par litre ; distillé une fois, il ne contient plus que 2,5 γ par litre.

L'acide *chlorydrique* pur contient souvent 70 γ au litre. Il est dilué au demi, ainsi il distille comme un corps pur. Le distillat est exempt de plomb.

Pour l'acide *sulfurique*, il faut un appareil différent (*fig.* 3).

La distillation de l'acide sulfurique est facile, si on fait plonger dans

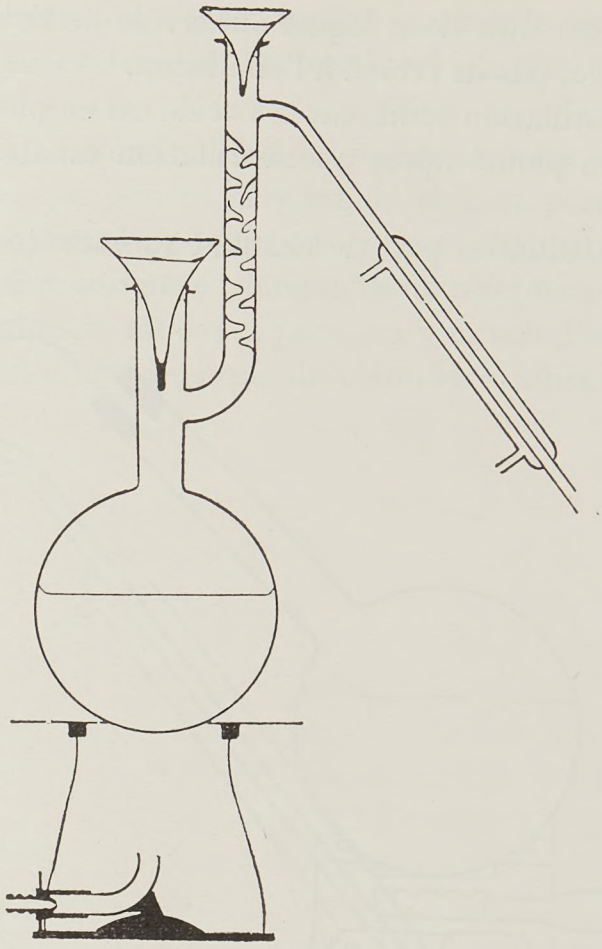


FIG. 2.

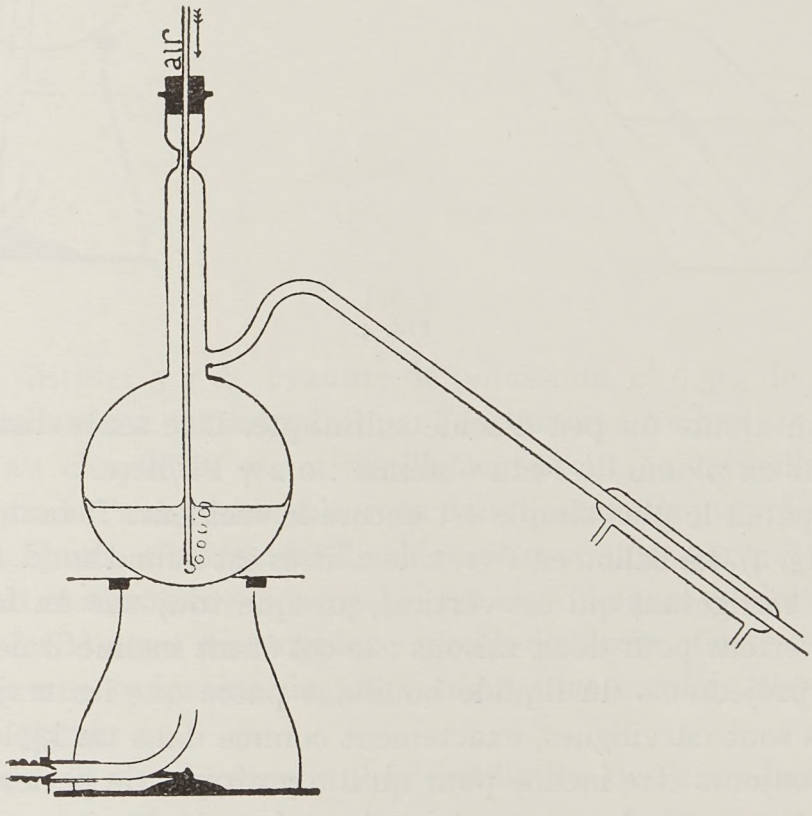


FIG. 3.

l'acide bouillant un tube dans lequel on envoie de l'air légèrement comprimé, ainsi il n'y a pas de retard à l'ébullition.

Une seule distillation suffit, car cet acide est employé en petite quantité. Sa teneur en plomb après une distillation est de l'ordre de 2 γ au litre.

Pour l'*eau distillée* on part de l'eau du robinet (40 à 100 γ Pb/litre) à

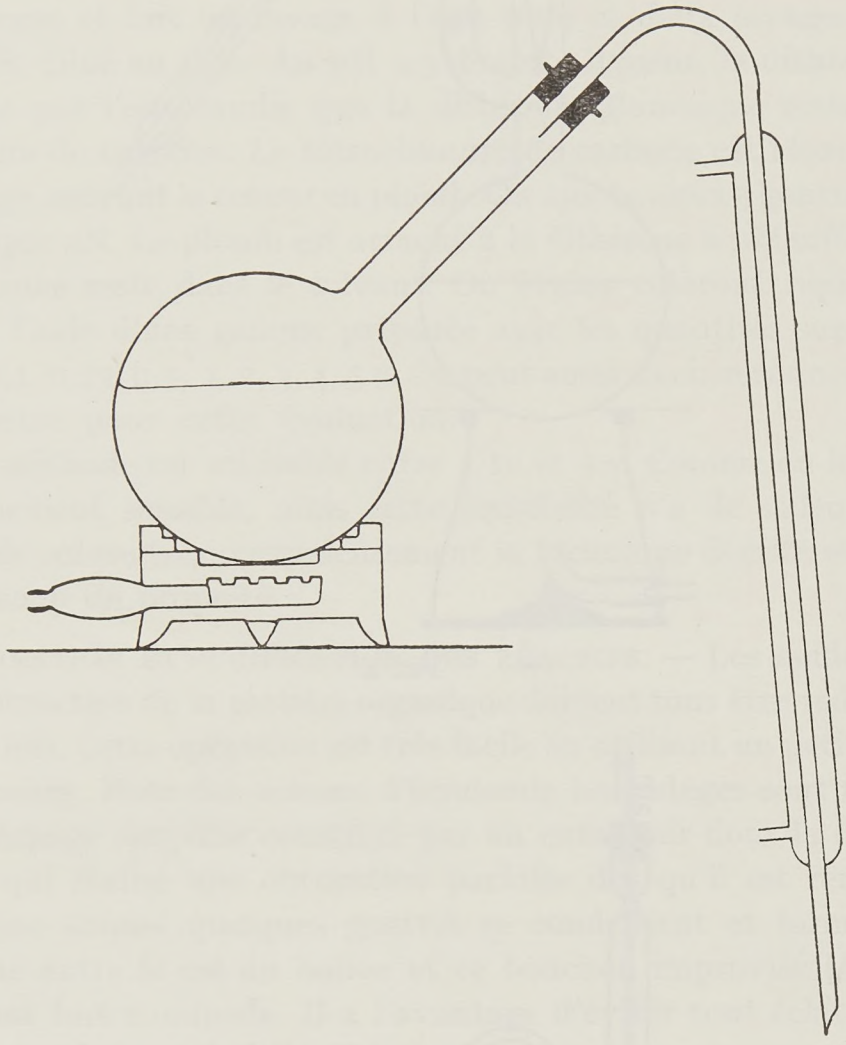


FIG. 4.

laquelle on ajoute un peu d'acide sulfurique. Une seule distillation suffit. Teneur en plomb de l'eau obtenue : 0,2 γ Pb/litre.

L'appareil le plus simple est encore le meilleur. Il faut pourtant le décrire (*fig.* 4). Le ballon en Pyrex de 2 litres est à fond rond. Il est incliné et c'est le réfrigérant qui est vertical, presque toujours on fait l'inverse. C'est une erreur pour deux raisons : le col étant incliné il ne peut pas y avoir de projections du liquide bouillant parce que les trajectoires des particules sont curvilignes, exactement comme dans un kjeldhal dont le col doit toujours être incliné pour qu'il n'y ait pas de pertes. Le réfrigérant doit être vertical pour que toute la surface du verre participe à l'acte

réfrigérateur. Au contraire s'il est incliné comme le font la plupart des chimistes, seule la génératrice la plus basse sert à la réfrigération du liquide qui s'y condense.

Pour préparer la solution d'*acétate et de cyanure d'ammonium sulfité* ou A. C. N. S., qui permet la solubilisation du plomb tout en complexant le cuivre et les traces de fer qui ont pu échapper à la purification, on opère de la manière suivante : dans le flacon récepteur en Pyrex (*fig.* 5), on place une centaine de ml d'eau pure, on y envoie l'ammoniac gazeux provenant de 70 ml d'ammoniaque du commerce. Ensuite on place dans

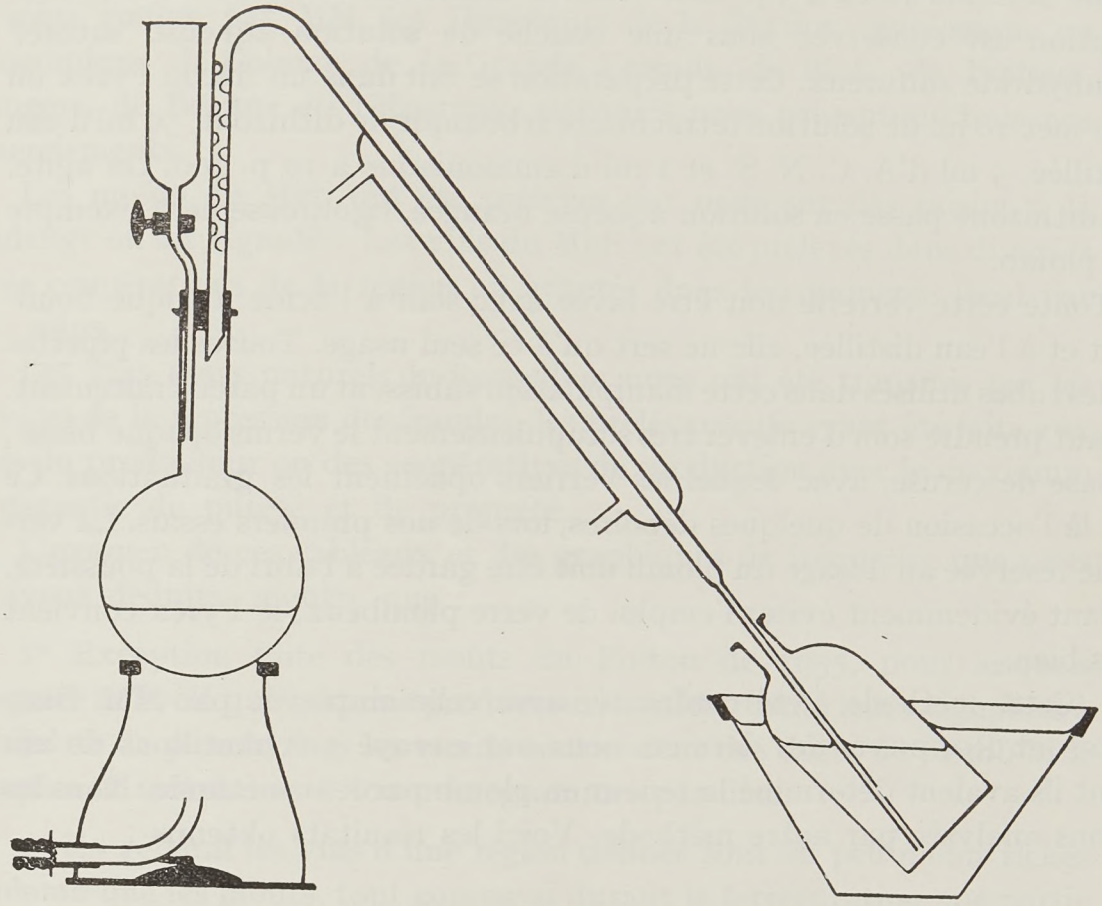


FIG. 5.

le ballon à distiller 5 g de cyanure de potassium et 0,5 g de métabisulfite de potassium sec. On introduit par l'entonnoir à robinet, 25 ml d'acide sulfurique au cinquième et on distille lentement en recueillant l'acide cyanhydrique et l'anhydride sulfureux dans l'ammoniaque précédemment distillé. On ajoute alors 35 ml d'acide acétique pur, porte à 250 ml le volume total et ajuste le pH à 9,5 qui est le pH auquel on doit faire l'extraction et les lavages du complexe plomb-dithizone. Cette liqueur doit être stockée une quinzaine de jours avant tout emploi, elle doit avoir légèrement jauni.

Cet appareil sert également à la distillation de l'ammoniaque et du tétrachlorure de carbone.

Pour que cette méthode soit vraiment très sensible, c'est-à-dire pour pouvoir déceler des quantités de plomb inférieures au gamma, il est indispensable d'avoir un *tétrachlorure de carbone* exempt de chlore et d'oxychlorure de carbone, qui brûleraient les traces de dithizone à la dernière phase du dosage. Le tétrachlorure est conservé sous une couche de solution de sulfite de sodium et de carbonate de sodium. On le dessèche sur chlorure de calcium, on le distille. Ensuite on le conserve sous une couche d'A. C. N. S.

La solution de *dithizone* est préparée au moment de l'emploi à partir d'une solution stock à 3 p. 1000 dans le tétrachlorure de carbone ; cette solution est conservée sous une couche de solution aqueuse saturée d'anhydride sulfureux. Cette préparation se fait dans un flacon Pyrex où l'on met 10 ml de solution tétrachlorocarbonique de dithizone, 50 ml d'eau distillée, 5 ml d'A. C. N. S. et 1 ml d'ammoniaque à 10 p. 100. On agite. La dithizone passe en solution aqueuse orangée, rigoureusement exempte de plomb.

Toute cette verrerie doit être lavée avec soin à l'acide nitrique bouillant et à l'eau distillée, elle ne sert qu'à ce seul usage. Toutes les pipettes et les tubes utilisés dans cette manipulation subissent un pareil traitement. Il faut prendre soin d'enlever très scrupuleusement le vernis opaque blanc, à base de céruse, avec lequel les verriers opacifient les graduations. Ce fut là l'occasion de quelques déboires, lors de nos premiers essais. La verrerie réservée au dosage du plomb doit être gardée à l'abri de la poussière. Il faut évidemment éviter l'emploi de verre plombeux, le Pyrex convient très bien.

Cette méthode a été confrontée avec celle employée par MM. Bremond et Roubert. Ces derniers nous ont envoyé 5 échantillons de vin dont ils avaient déterminé la teneur en plomb par leur méthode. Nous les avons analysés par notre méthode. Voici les résultats obtenus :

	Dosages Alger	Dosages Montpellier
vin blanc Alger	0,18 — 0,17	0,18
vin blanc Alger	0,06 — 0,04	0,06
rosé Alger	0,12 — 0,10	0,14
rouge Constantine	0,27 — 0,30	0,33
rouge Oran	1,80 — 1,75	1,75

Comme on le voit la concordance est bonne entre les deux méthodes, étant donné qu'il s'agit de méthodes colorimétriques. Les vins étudiés couvrent une grande étendue de concentrations.

Pour notre part nous avons souvent refait deux, trois ou même quatre fois la détermination du plomb dans les vins que nous avons examinés, en particulier lorsque nous avons trouvé des doses élevées.

III. — RÉSULTATS DE NOS DÉTERMINATIONS

Nous avons réuni dans les tableaux ci-dessous le résultat de dosages que nous avons effectués sur des moûts et des vins d'origines très diverses.

Les moûts et les vins d'Alsace, du Bordelais, de la Loire, du Poitou, de l'Anjou, de la Bourgogne, de la Champagne, ont été prélevés à la demande de l'Institut National de la Recherche Agronomique avec tous les soins voulus par MM. les Directeurs de la Station œnologique ou agronomique de Colmar, de la Grande Ferrade, de Blois, de Poitiers, d'Angers, de Beaune et d'Epernay, auxquels nous présentons tous nos remerciements.

Les moûts du Midi ont été prélevés par nous sur des raisins à la vendange ou au vignoble. Les vins du Midi ont été prélevés dans diverses caves coopératives de la région ou achetés dans le commerce local par nos soins.

Les vins doux naturels du Roussillon nous ont été transmis par les Services de la répression des fraudes, les prélèvements ayant été faits aux chais du producteur ou des coopératives de production avec le maximum de garantie de pureté et de propreté.

L'examen de ces tableaux et des graphiques de fréquence que nous en avons déduits, montre que :

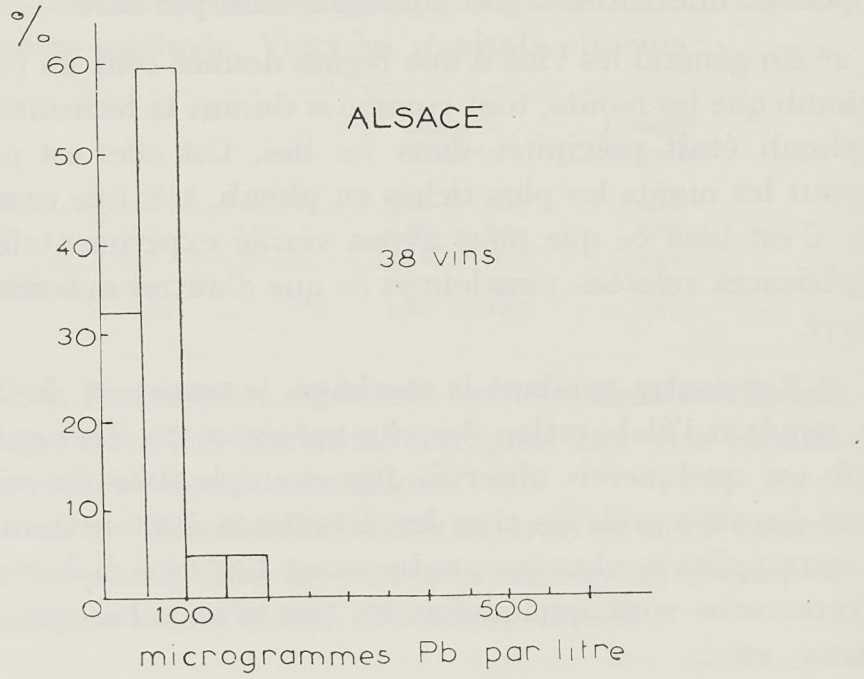
1° Exception faite des moûts du Poitou de 1955, pour lesquels l'enquête a révélé que certains producteurs avaient traité leurs vignobles à l'arséniate de plomb, tous les moûts contiennent des doses de plomb bien groupées et inférieures à 500 microgrammes par litre.

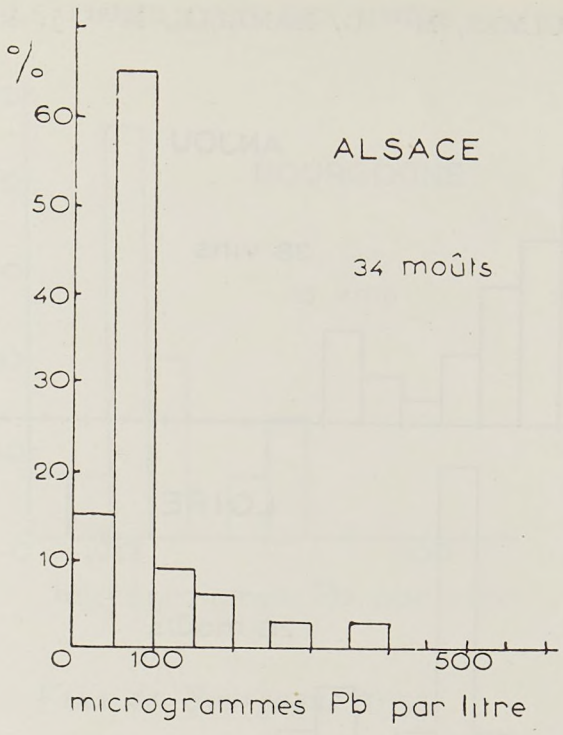
2° En général les vins d'une région donnée sont un peu moins riches en plomb que les moûts, tout comme si durant la fermentation une partie du plomb était précipitée dans les lies. Cet effet est particulièrement net pour les moûts les plus riches en plomb, tels que ceux du Poitou de 1955. C'est bien ce que nous avons vérifié expérimentalement au cours d'expériences relatées plus loin et ce que d'autres auteurs ont également observé.

3° Par contre pendant le stockage, le transport, la distribution des vins, pendant l'élaboration des vins spéciaux, un léger enrichissement en plomb est quelquefois observé. Par exemple dans les vins du Midi, la teneur des vins prélevés chez les détaillants était nettement plus élevée que ceux prélevés chez les producteurs. Les vins élaborés en mousseux, les vermouths sont quelquefois un peu plus riches que les vins nature initiaux, etc...

Lieu de production	Cépage	Moûts (Plomb en microgrammes par litre)	Vins (Plomb en microgrammes par litre)
Molsheim	Pinot	155	75
id.	Riesling	190	165
Dalisheim	?	400	
Rosheim	Sylvaner	< 10	25
Obernai	id.	< 10	
Barr	Auxerrois	100	
id.	?	50	
Mittelbergheim	Pinot gris	150	35
id.	Riesling	55	60
id.	Gewurztraminer	70	80
id.	Sylvaner	85	35
Andlau	Wichelsberg	60	45
id.	Kastelberg	80	40
Wallbach	Sylvaner I	85	
id.	Sylvaner II	75	80
Station recherches Colmar	Chasselas Rib.	120	110
id.	Muscat NC.	80	70
id.	Pinot gris Wz.	60	60
id.	id.	90	60
Spultzmatt	Pinot blanc	70	80
id.	Riesling	50	50
id.	Traminer	70	90
Westhalten	Sylvaner	75	
id.	Muscat	85	
id.	Tokay	50	
id.	Sylvaner	60	
id.	Muscat	70	60
id.	Gewurztraminer	80	
Pfaffheim	Pinot blanc	65	60
id.	Sylvaner	95	70
id.	Chasselas	60	
Voeglingshoffen	Traminer	260	100
id.	Muscat	100	50
id.	Riesling	105	
	Moyenne	92	67

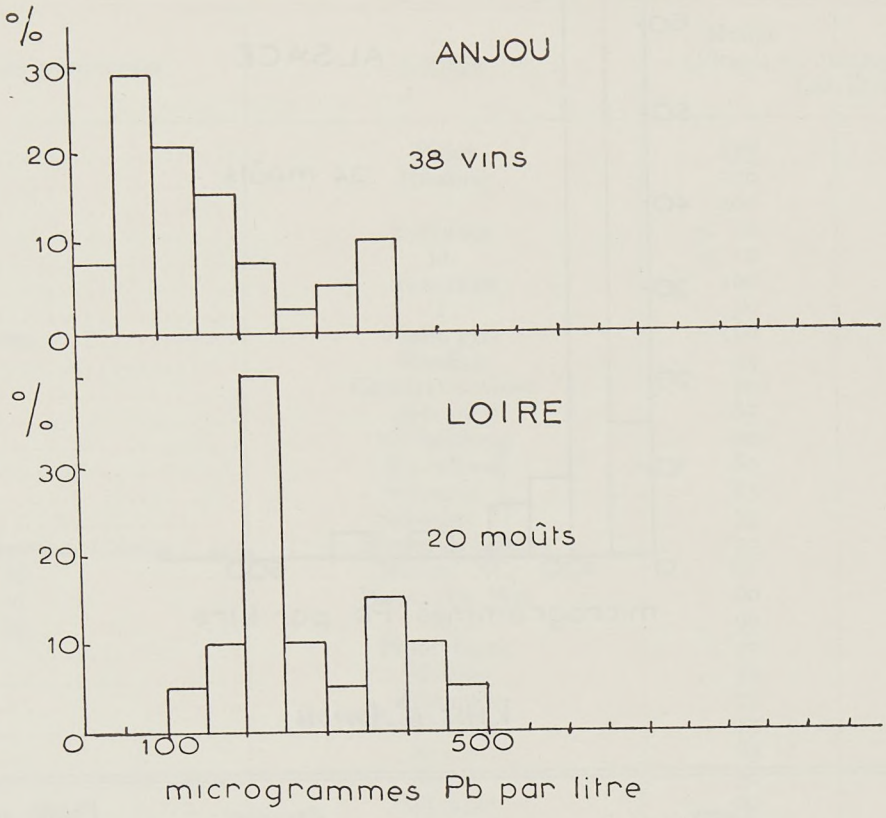
Le Riesling de Molsheim a été analysé deux fois.
Pour un certain nombre de vins, le dosage n'a pu être fait, parce que le vin avait été vendu.





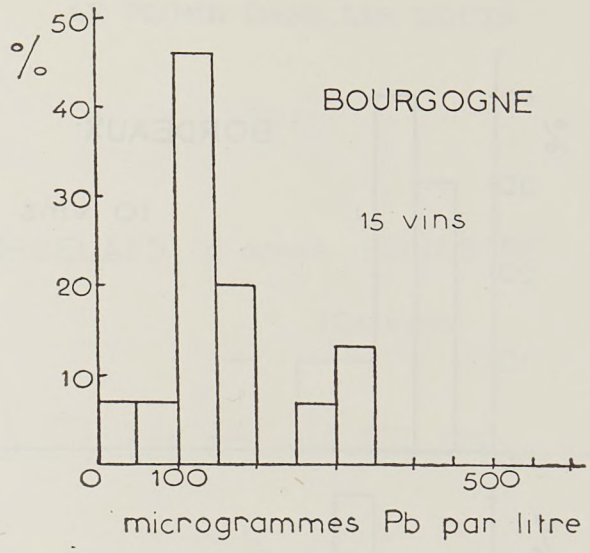
Vins d'Anjou

Lieux	Cépages	Plomb en microgrammes par litre
Saint-Florent-le-Vieil	Muscadet	60
Le Marillais	Muscadet	230
Saint-Florent-le-Vieil	Gros Plant	50
Le Thoureil	Gamay rose	100
Vanains	Rose Cabernet	150
Vauchretien	id.	360
Saint-Rambert du Lattrey	id.	400
Thomure	id.	170
Tancoignes	id.	225
Vranc de Lersay	id.	400
Montjean	id.	200
Saint-Saturnin	id.	180
Martigue Briand	id.	100
Bouille Saint-Paul	id.	50
Mollay par Breze	id.	100
Chaintre	Cabernet rouge	75
Vanains	id.	100
Vanains	id.	270
Vanains	id.	400
Vauchretien	Rosé d'Anjou	150
Tancoigne	id.	250
Chantre (Chateau de)	id.	60
Bouille Loretz	id.	120
Brissac	id.	80
Saint-Lambert de Lattrey	id.	200
Nueuil Lagon	id.	120
Martigne Briand	id.	80
Parnay	Chenin	200
Montjean	id.	150
Saint-Aubin de Luignes	id.	350
Brissac	id.	110
Rochefort sur Loire	id.	90
Ternay	id.	150
Roche aux Moines	id.	50
Beaulieu sur Lagon	id.	350
Bouille Loretz	id.	120
Murs	id.	170
Martigne Briand	id.	90



Moûts de la Loire 1955.

Lieu	Cépage	Plomb en microgrammes par litre
	1° Indre-et-Loire	
Bléré	Côt	420
Francueil	Landot 244	175
Ste-Radegonde	Gros lot	350
Nettray	Seibel 54/55	250
St-Symphorien	Grolot	125
	2° Indre	
Lye	Côt	250
Lye	Gamay	250
La Vernelle	Côt	400
id.	Sauvignon	185
id.	Côt	270
Dion	Gamay	400
	3° Loir-et-Cher	
Oisly	Arbois	500
Mont	Romorantin	420
Chemery	Neslier	250
Oisly	Neslier	225
Thesée	Gamay	225
Sambin	Neslier	250
Pouillé	Gamay	250
St-Georges	Côt	260
Chissay	Côt	360



Vins de Bourgogne 1955

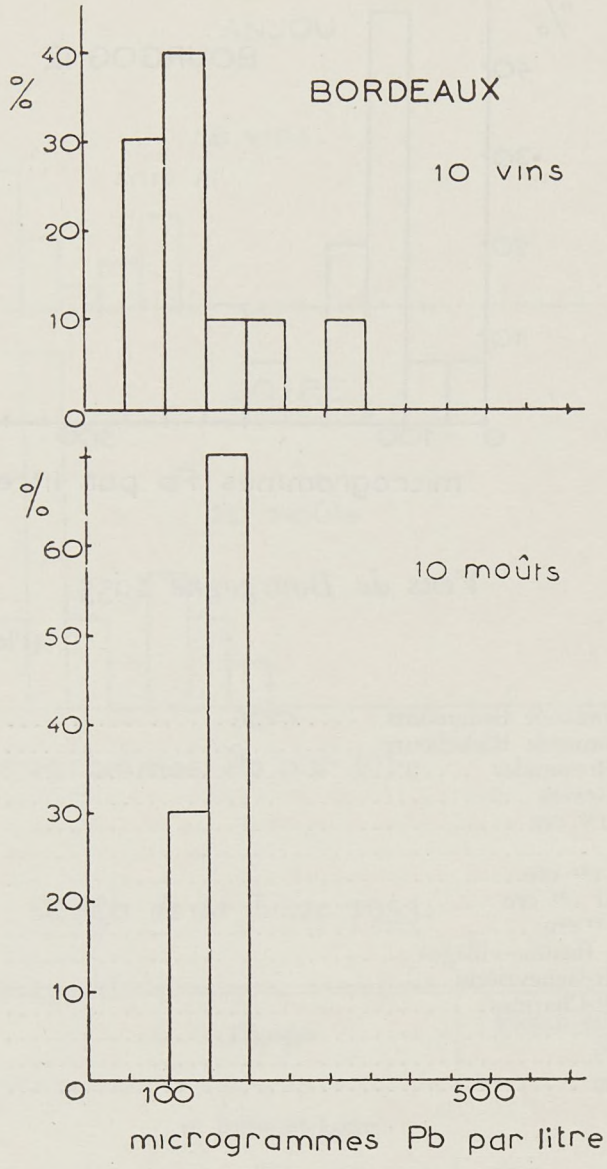
	(Plomb en microgrammes par litre)
Vosne-Romanée Beaumonts	190
Vosne-Romanée Richebourg	320
Beaune-Bressandes	120
Beaune-Greves	270
Beaune 1er cru	307
Corton	160
Savigny 1er cru	170
Pommard 1er cru	115
Volnay 1er cru	140
Côtes de Beaune-villages	120
Meursault-Genevrières	85
Meursault-Charmes	125
Volnay	120
Gevrey	5
Chassagne	140

Vins des Côtes du Rhône 1955

Rouge	240
Blanc	25

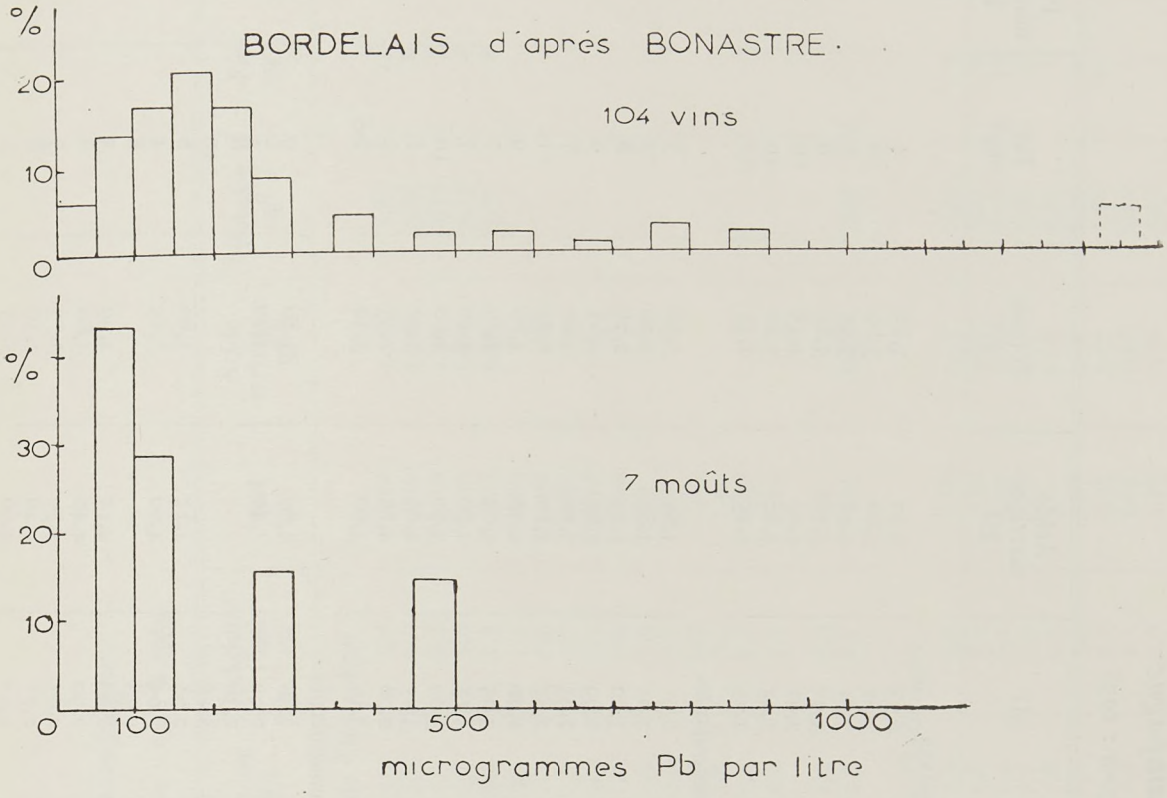
Moûts et vins du Bordelais 1955.

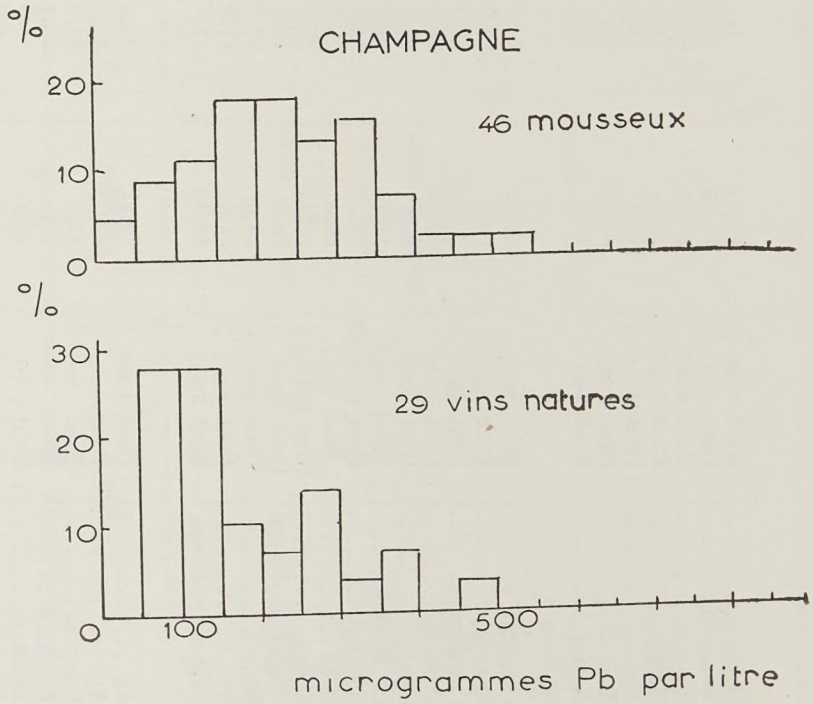
Cépage	Moûts (Plomb en microgrammes par litre)	Vins (Plomb en microgrammes par litre)	Couleur du vin
Semillon	175	250	B
Muscadelle	190	150	B
3 cépages blancs	150	160	B
Cabernet franc	160	350	R
Malbec (sur 420 A)	140	—	B
Malbec (sur 420 A et 3309)	175	125	R
Merlot blanc		100	B
Sauvignon	125	115	B
Cabernet sauvignon	175	130	R
Merlot	120	65	R
Petit verdot	165	75	R



Champagnes achetés dans le commerce en 1958

				Plomb en microgramme
Reims	Sec 1945			400
Reims	Sec 1950			350
Reims	Brut 1941			300
Reims	Brut 1943			320
Reims	Brut 1945			350
Reims	Brut 1947			350
Reims	Brut 1949			250
Reims	Brut 1952			250
Reims	Brut 1955			400
Reims	Brut 1956			25
Reims				40
Reims				100
Epernay	1957			125
Epernay	1957			200


%
BORDELAIS d'après BONASTRE.
20
10
0
104 vins
%
30
20
10
0
100
500
1000
7 moûts
microgrammes Pb par litre


%
CHAMPAGNE
20
10
0
46 mousseux
%
30
20
10
0
100
500
29 vins natures
microgrammes Pb par litre

Vins de champagne

Date des analyses : 1956

Origine	Qualité Année	Alcool	Sucres g/l	Acidité totale g/l	pH	Acide tartrique g/l	Potasse g/l	Fer mg/l	Plomb en microgrammes par litre
				Coopératives					
Reims	Brut 1949	12,0	7,5	5,6	2,95	3,95	3,85	4	200
Vincennes	Brut 1953	11,65	16,3	5,9	3,02	3,60	3,10	10	100
Avize	Brut 1947	11,75	13,1	5,4	3,05	4,45	3,55	7,5	250
Mailly	Brut 1951	12,0	13,1	6,1	3,05	3,75	3,85	6	150
Ay	Brut 1949	11,8	11,9	6,6	2,91	4,05	4,35	16	275
Avize	Brut 1953	11,55	19,2	6,1	2,95	3,85	3,10	10	420
Mesnil	Brut 1953	12,5	12,5	6,05	2,95	5,45	2,55	12	125
				Récoltants-manipulants.					
Cramant	Brut 1952	11,95	11,1	5,3	2,9	3,85	3,30	5	210
Epernay	Brut 1952	12,8	16,0	4,9	3,01	3,85	3,50	3	220
Cumières	Brut 1952	12,45	10,0	4,9	3,00	4,25	2,75	8	150
Damery	Brut 1949	12,35	18,5	5,2	2,99	2,65	2,65	9	275
Pierry	Brut 1953	11,8	16,3	5,1	2,95	3,50	3,00	7	250
Le Mesnil	Brut 1953	11,45	20,0	5,1	2,87	3,10	2,75	11	375
Epernay	Brut 1950/52	12,15	15,0	5,6	2,90	4,30	3,10	9	125
Oger	Brut 1952	12,2	11,1	5,1	3,05	4,05	3,19	7	200
Bouzy	Brut 1952/53	12,35	12,8	4,7	3,15	4,70	3,40	7	100
Chigny-les-Roses	Brut 1947	12,3	12,8	5,3	3,00	3,90	3,10	10	480
Bouzy	Brut 1953	11,95	15,6	5,7	3,05	4,05	3,30	7	100
Ay	Brut 1949	11,85	17,8	6,1	2,96	4,15	2,55	9	160
Chigny-les-Roses	Brut 1947	12,85	17,8	4,3	3,15	3,00	3,30	7,5	175
				Négociants-manipulants					
Ay	Brut 1947	12,35	11,9	5,3	2,98	4,80	3,50	9	350
Ay	Brut —	12,65	11,1	5,4	2,90	3,40	3,00	7	225
Epernay	Brut —	12,5	14,7	6,2	2,98			8	275
Epernay	Brut —	12,0	10,4	5,1	3,10			10	175
Epernay	Brut —	12,1	8,6	5,6	2,98	4,15	3,50	8	300
Epernay	Brut —	12,4	8,6	5,0	3,05	4,00	3,25	4	325
Reims	Brut	12,55	12,2	5,3	2,98			8	200
Reims	Brut 1949	12,3	13,3	5,8	2,98	4,15	3,30	5	530
Reims	Brut	11,5	13,1	6,9	2,90	4,40	3,60	8	250
Reims	Demi-sec	11,45	47,0	7,1	2,85	3,70	3,75	5	350
Reims	Brut extra	11,8	16,6	7,3	2,75	5,20	4,30	8	300
Reims	Brut	12,2	11,6	6,3	2,90	4,90	3,35	5	200

Vins de Champagne.

Dates des analyses : 1956 à 1959.

Origine	Cépages	Année de récolte	Alcool	Sucres g/l	Acidité totale g/l	pH	Acide tartrique g/l	Potasse g/l	Fer mg/l	Plomb microgrammes par litre
Vins natures de Champagne										
Cumières		1955	10,6	3,7	6,0	3,10	4,50	3,85	11	140
Chigny		1955	10,55	1,5	7,6	3,10	4,50	3,85	6	160
Mesnil	Blanc de blanc	1953	11,0	1,7	6,2	3,10	4,70	2,75	7	210
Ay	id.	1949	11,1	1,3	6,6	3,02	5,80	3,15	4	170
Trepail		1955	9,75	16,6	7,3	3,02	5,35	3,75	4	110
Hautvillers	Pinots noirs	1955	10,3	3,1	7,3	2,85				77
Hautvillers	id.	1955	11,0	1,5	6,7	2,90				95
Chouilly	Blanc de blanc	1955	10,05	2,1	7,7	2,80				150
Leuvrigny	Meuniers	1955	11,0	2,1	6,7	2,92				125
id.	id.	1955	10,2	1,6	6,6	2,92				85
id.	id.	1955	10,2	1,6	3,5	3,6				70
id.	id.	1955	10,25	2,6	7,1	2,88				105
Broyes	id.	1955	10,7	3,6	6,7	2,85				180
Villers-Marmery	Blanc de blanc	1955	10,25	1,8	7,4	2,90				65
id.	id.	1955	10,15	1,4	7,0	2,90				75
Vertus	id.	1955	10,75	5,4	7,4	2,6				145
Vertus	id.	1955								130
Vertus	id.	1955	11,6	2,3	7,3	2,7				100
Cramant	id.	1955	10,9	4,5	8,7	3,05	5,95	3,95		230
Epernay		1958								100
Vins rouges de Champagne										
Ambonnay		1955	11,05	2,2	5,9	3,50	2,35	7,35	4	270
Trepail		1955	11,8	1,8	6,0	3,30	3,60	5,75	9	375
Vertus		1954/55	12,1	1,4	6,0	3,30	3,20	6,00	10	315
Bouzy		1953	11,7	2,7	3,9	3,8	2,55	6,80	10	140
Bouzy		1953	11,8	1,8	4,0	3,6	3,00	5,35	8	285
Vertus		1952/53	11,35	1,8	5,3	3,38	3,60	6,10	10	460
Cumières		1952/53	11,8	1,6	4,2	3,35	3,20	4,80	12	280
Vertus		1947	10,75	1,8	4,1	3,65	2,55	6,00	7	375
Bouzy		1943	10,9	2,5	4,0	3,70	2,00	5,65	4	270

Midi de la France

(Hérault — Gard — Aude — Pyrénées-Orientales)

Moûts		Plomb en microgrammes par litre
—		—
Aramons de Castelnau	1957	30
— id —	1959	100
Clairettes de Castelnau	1959	75
Grenaches Trouillas	1958	25
— — (raisins lavés)	1958	25
Muté désulfité blanc Montpellier	1955	280
Muté désulfité rouge —	1955	225
Muté désulfité blanc —	1958	250
Muté désulfité rouge —	1958	200
Muté désulfité blanc —	1959	25
Muté désulfité rouge —	1959	160
Muté	1955	450
Moûts concentrés au 1/5 en volume sous vide dans appareil en fonte émaillée.		
Lunel	1947	1 100
Lunel	1955	1 800
Marsillargues	1957	2 360
Perpignan	1958	1 500

Vins vendus par des détaillants de Montpellier.

	Plomb en microgrammes par litre
	—
Vins rouges 1946-47	360
(analyses de Mlle ACHARD)	480
	640
	360
	520
	267
	500
	400
	20
	600
	370
	100
	400
	480
	600
	70
	150
	440
Vins rosés 1946-47	360
(analyses de Mlle ACHARD)	360
	325
Vins blancs 1946-47	200
(analyses de Mlle ACHARD)	600
	640
	400
	200
	340
Vin blanc Midi Z 1952	200
— — Z 1952	500
Vin blanc Y 1958	100
— — Y 1958	25
— — Y 1956 après 2 ans de fûtaille	25
— — Y 1955 après 3 ans de fûtaille	25

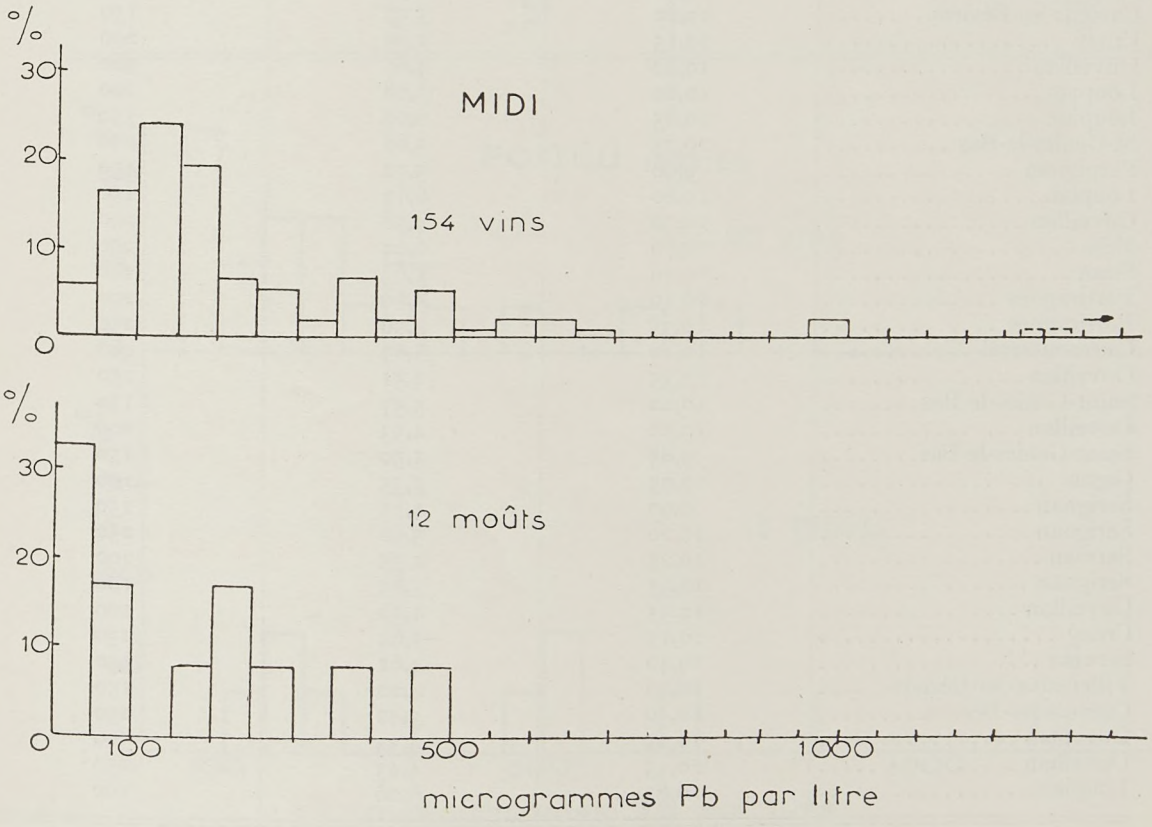
Vins provenant directement de caves coopératives.

		Plomb en microgammes par litres
Vins rouges de l'Hérault (analyses de Mlle Achard)	1947	120
		1 000
		10
		20
		70
		170
		190
		300
		100
		170
		200
		150
		100
		80
		50
		100
		100
		50
Vin de Trouillas	1958	25
Vin de Tuchan	1956	75
Vin de Saint-Cyprien	1958	115

Vinaigres vendus par des détaillants de Montpellier en 1947.

(analyses de Mlle Achard)

	640
	200
	600
	370
	470



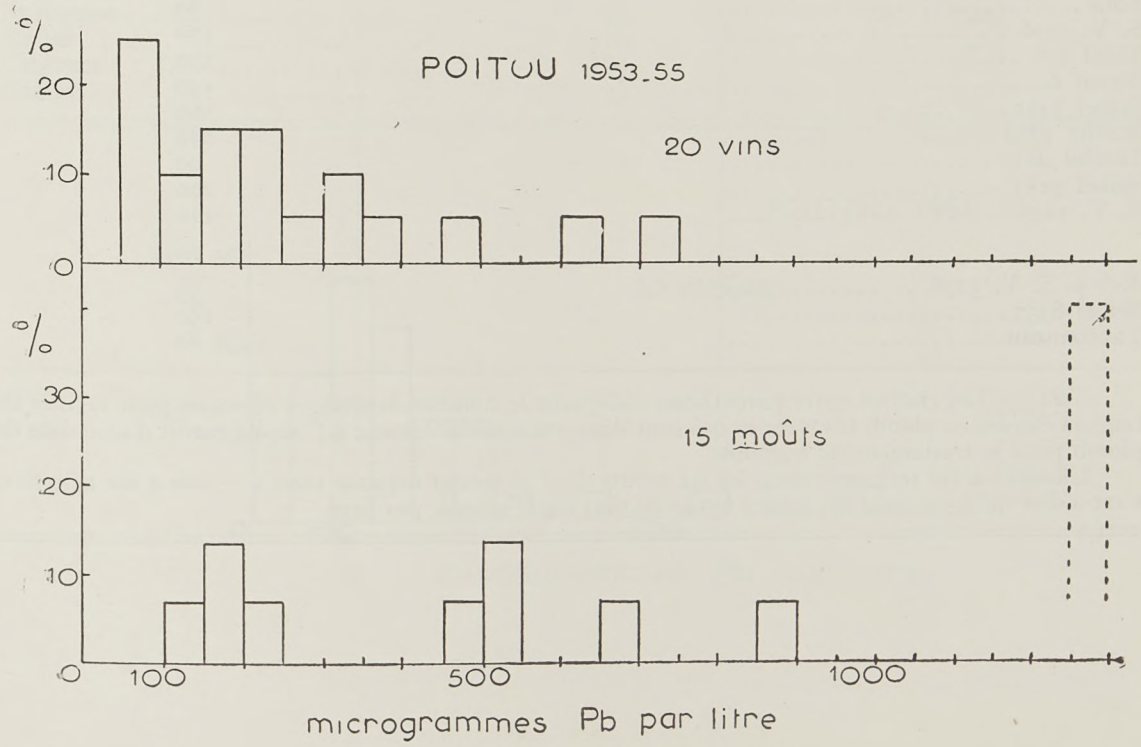
Vins rouges du Midi – 1957

Analyses faites en 1958.

Provenance	Degré alcoolique	Acidité totale $SO_4 H_2$ g/litre	Plomb en microgrammes par litre
Pezenas	9,95	5,48	140
	10,05	5,52	140
	10	5,57	100
	10,05	5,58	160
	10,05	5,48	155
	10	5,49	100
	10,05	5,67	150
Argelès-sur-Mer (P. O.)	10,65	5,71	125
	10,60	5,49	240
	10,45	5,48	130
Pezenas	9,90	5,78	130
Codolet (Gard)	11,10	5,24	125
Pezenas	9,95	5,73	175
Pezenas	9,95	5,58	90
Montpellier	9,80	5,21	190
Bagnols-sur-Ceze (Gard)	10,75	5,30	90
Ouveillan	10,35	4,58	75
Servian	10,65	4,84	160
Nissan	10,05	4,40	150
Villeneuve-les-Béziers	10,45	6,12	625
Nissan	10,20	4,64	680
Villeneuve-les-Béziers	10,15	5,97	300
Nissan	10,30	4,68	1 000
Ouveillan	10,35	4,60	980
Cournonterral	10,90	5,66	420
Cruzy	10,10	5,79	200
Cournonsec	11,00	6,35	375
Siran	10,55	5,68	225
Portiragnes	10,05	5,69	360
Salleles-d'Aude	9,90	4,79	1 200
Cournonterral	10,30	6,34	250
Cazouls-les-Béziers	10,20	5,57	150
Cruzy	10,15	5,65	200
Ouveillan	10,40	4,67	500
Loupian	10,80	5,98	200
Loupian	10,85	6,08	350
St-Genies-le-Bas	10,25	5,68	200
Perpignan	9,90	5,72	450
Loupian	10,80	6,13	150
Ouveillan	10,30	4,58	200
Meze	10,70	6,04	200
Siran	10,70	5,63	100
Portiragnes	10,10	5,60	200
Portiragnes	10,35	5,50	250
Cournonterral	10,20	6,09	480
Ouveillan	10,35	4,51	150
Saint-Genies-le-Bas	10,40	5,57	150
Ouveillan	10,30	4,53	200
Saint-Genies-le-Bas	9,85	5,50	150
Gignac	10,05	5,35	100
Serignan	9,90	4,75	150
Serignan	10,20	5,92	250
Servian	10,25	4,55	200
Serignan	10,35	5,83	180
Ouveillan	10,35	4,52	100
Cruzy	10,15	5,64	150
Servian	10,40	4,62	150
Villeneuve-les-Béziers	10,30	4,20	150
Cazouls-les-Béziers	10,30	5,42	250
Ouveillan	10,35	4,53	500
Ouveillan	10,35	4,43	150
Loupian	10,85	6,06	100

Vins rouges du Midi 1957 *(Suite).*

Provenance	Degré alcoolique	Acidité totale $SO_4 H_2$ g/litre	Plomb en microgrammes par litre
Tourbes	10,45	5,63	500
Villeneuve-les-Béziers	10,20	6,02	200
Quarante	9,85	4,25	150
Cruzy	10,20	5,60	200
Salleles-d'Aude	9,85	5,16	250
Saint-André-de-Sangonis	10,95	6,02	150
Cruzy	10,15	5,65	200
Sallèles-d'Aude	10,05	5,27	150
— —	9,85	4,82	150
— —	9,75	5,02	100
Cournonsec	10,75	6,24	150
Portiragnes	10,10	5,49	300
Cournonsec	10,70	5,91	300
Cournonterral	10,10	6,29	280
Pignan	10,15	5,61	100
Vinassan	10,55	6,01	200
—	10,55	5,96	180
—	10,55	6,01	150
—	10,55	5,97	300
—	10,50	6,06	100
—	10,55	6,07	100
Poussan	10,50	6,01	200
Rougean	10,65	6,18	150
St-Pargoire	10,40	6,33	150
Montpellier	10,00	5,85	150
Montpellier	9,80	5,16	250
Montpellier	9,80	5,16	300
Montpellier	10,05	5,90	200
Bagnols-sur-Cèze	10,80	5,45	250
Rougean,	10,70	6,03	250
Cardet	9,40	4,14	130
	9,25	4,72	140
	9,20	4,72	140
	9,20	4,76	130
Perpignan	12,6		100
	12,2		100
	12,5		150
	12°		120



Moûts et vins du Poitou

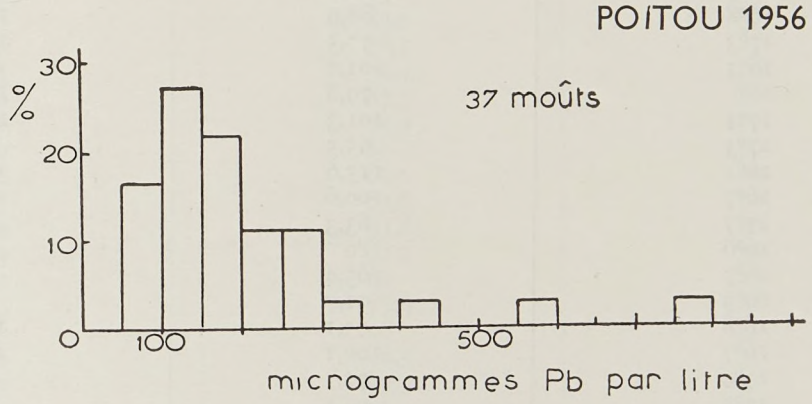
Cépages	Moûts	Vins
	(Plomb en microgrammes par litre)	
	1955	
S V 18 283	900	
Seibel 5455	2 800 (4)	
Seibel 13 666	520	
Landot 244	1 200 (2)	
Landot 2283	1 400 (4)	
Seibel 14404	700	
S. V. 18315	1 200 (3)	
Seibel 11803	3 200 (3)	
S. V. 5276	1 050	
Galibert 11528	150	
Ravat 6	500	
Bacco 22 A	525	
Landot 2281	180	
Seibel 9110	220	
Landot 2282	200	
		1953
S. V. 27289		240
Vidal 100		320
Landot 2281		725 (2)
Seibel 12309		210
Semillon		485 (2)
S. V. 18315		100
Johanes Seyne 30662		300
Cabernet		650 (2)
		1954
Folle		80
S. V. 5276		170
Vidal 256		350
Ravat 6		140
Seibel 5455		360
Burdin 7334		210
Landot 4611		90
Seibel 7053		200
S. V. 12286		110
		1955
R-6-+ S. V. 5276		65
Seibel 8357		190
Fauconneau		60

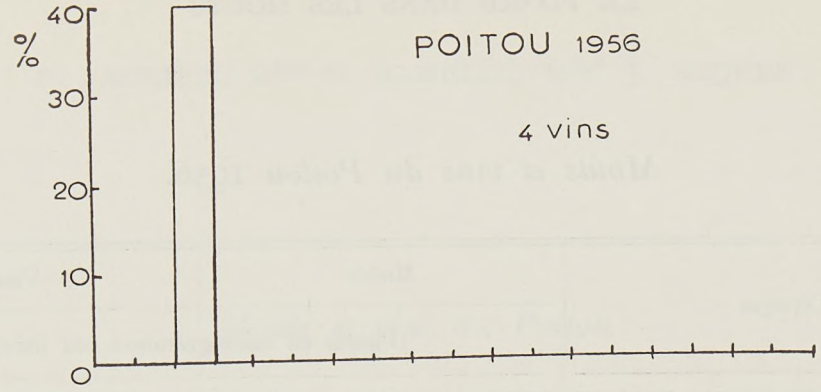
Nota. — Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de dosages effectués pour vérifier les teneurs élevées en plomb trouvées et qui sont dues vraisemblablement à l'emploi tardif d'arséniate de plomb pour le traitement du vignoble.

L'arsenic a été recherché dans les six moûts dont la teneur dépasse 1000 γ — elle a été négative, c'est-à-dire qu'il y a dans ces moûts moins de 0,02 mg d'arsenic par litre.

Moûts et vins du Poitou 1956.

Cépages	Moûts	Vins
	(Plomb en microgrammes par litre)	
Mélanges provenant de grandes cultures	150	
	200	
	125	
	175	
	150	
	200	
	250	
	200	
	400	
	175	
	350	
	125	
	450	
	150	
	800	
	600	
	300	
S. 10173	150	
Meynien 6	250	
L. 2282	300	
S. V. 5276	100	
L. 2281	150	
Ravat 6	150	
S. 11803	150	
S. V. 19233	200	
L. 244	100	
S. V. 18402	275	
S. V. 18283 Rouge	250	
S. V. 18315	75	
S. 8357	90	
S. 5455	200	
S. 7053 Rouge	250	
13666	140	
Sauvignon	75	140
Malbec	300	140
Cabernet	185	140
Gamay	75	150





Vins doux naturels du Roussillon

Appellation contrôlée : Banyuls.
Cépages : Grenache 90-95 % + Muscat 5 à 10 %

Alcool acquis	Sucre restant	Plomb en microgrammes par litre
16°2	94	100
17°3	90,4	50
16°7	90,9	125
17°3	97,3	100
16°3	100	125
17°7	77,5	100
17°	83	125
17°7	70,8	140
16°1	97,5	100
16°2	106,2	200
18°	70,6	75
17°5	94,4	500
17°	87	150
17°	75	175
16°6	102,5	350
16°9	85,9	125
17°	81,7	100
15°9	96,5	125
17°2	86,3	100
17°9	91,6	175

Appellation contrôlée : Maury
Cépages : Grenache 90-95 % + Muscat 5-10 %

16°8	93,4	150
17°1	88,6	150
17°3	90	200
17°4	87,2	200
16°9	82,9	100
17°1	82,4	150
16°7	94,9	200
16°3	102,8	175
16°8	88,9	150
17°3	77,5	200
16°7	101,2	190
18°	79,8	100
17°4	101,3	100
17°3	95,5	75
16°	115,6	125
16°7	100,6	50
17°7	83,3	90
16°6	110	50
16°7	105,4	90
16°9	91,7	25
16°8	93,1	100
16°7	100,1	150
17°4	72,1	50
17°3	94,1	25
15°8	116,3	150
17°4	80,1	40

Vins doux naturels du Roussillon (suite)

Appellation contrôlée : Rivesaltes.
Cépages : Grenache 85 % Macabeu 15 % ou Muscat

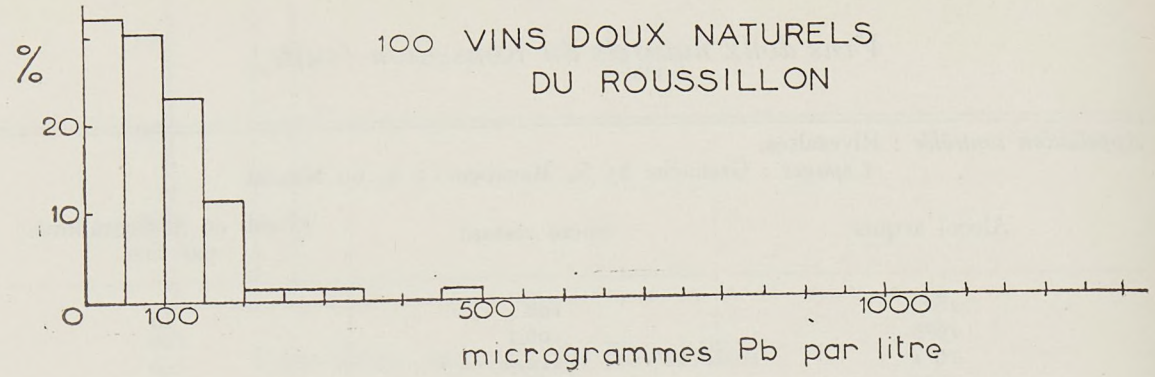
Alcool acquis	Sucre restant	Plomb en microgrammes par litre
16°2	100	75
16°6	106,1	100
16°1	112,5	90
17°1	88,1	75
17°	85,6	50
15°7	106,3	50
15°8	107	75
16°9	90,4	25
16°3	94,9	50
16°	106,1	200
15°8	95	125
16°1	95,5	50
18°8	65,1	150
15°8	103,6	100
16°4	106,1	200
16°2	92,7	25
17°1	89,8	40
16°7	87,6	50
16°7	92,9	50
16°3	90,5	90

Appellation contrôlée Côtes d'Agly.
Cépages : Grenache 85 %. Macabeu 15 %.

16°7	84,5	100
17°5	72,3	75
16°7	96,8	100
15°7	116	100

Appelation contrôlée : Côtes de Haut Roussillon.
Cépages : Grenache 85 %.Macabeu 15% ou Muscat.

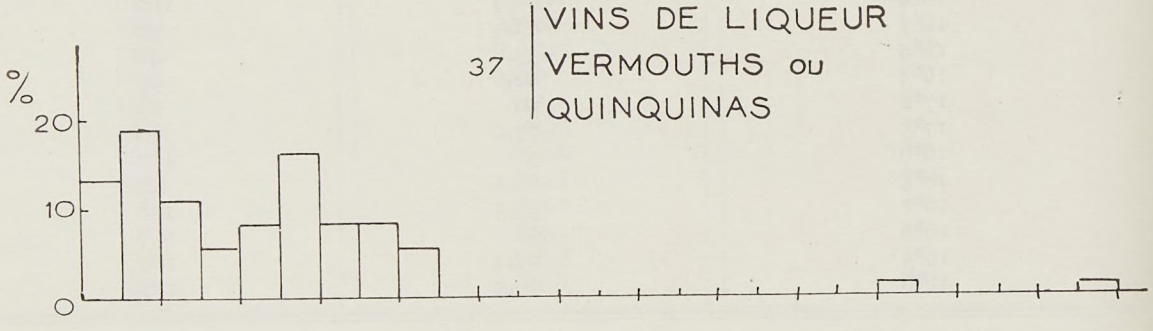
17°1	104,6	150
17°4	76,4	50
16°7	92,5	50
17°4	72,7	50
16°4	98,4	50
15°8	111,4	25
16°5	108,1	275
17°5	81	140
15°9	105	30
16°2	102,3	25
18°3	62,1	225
16°6	95	125
16°7	83,7	50
17°6	76,7	25
18°4	59,4	100
16°6	87,7	50
17°6	75,9	100
19°9	61	150
16°9	86,9	100
16°7	83,6	40
16°4	93,8	40
16°5	92,6	50
17°2	90	25
17°3	77,4	40
16°6	96	150
18°4	66,5	50
16°2	93,5	150
16°9	96	150
16°5	95,4	100
16°6	96,5	100



Vins de liqueur.

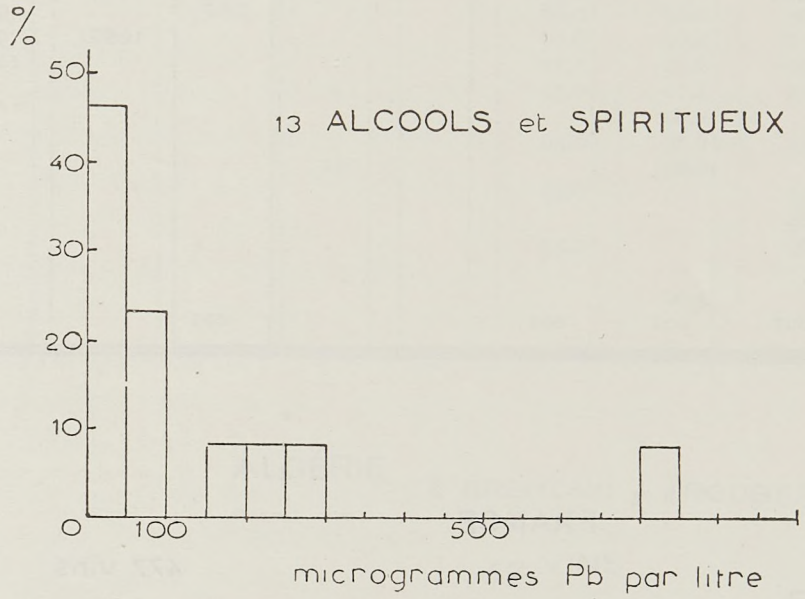
Mistelles - Vermouths et Quinquinas

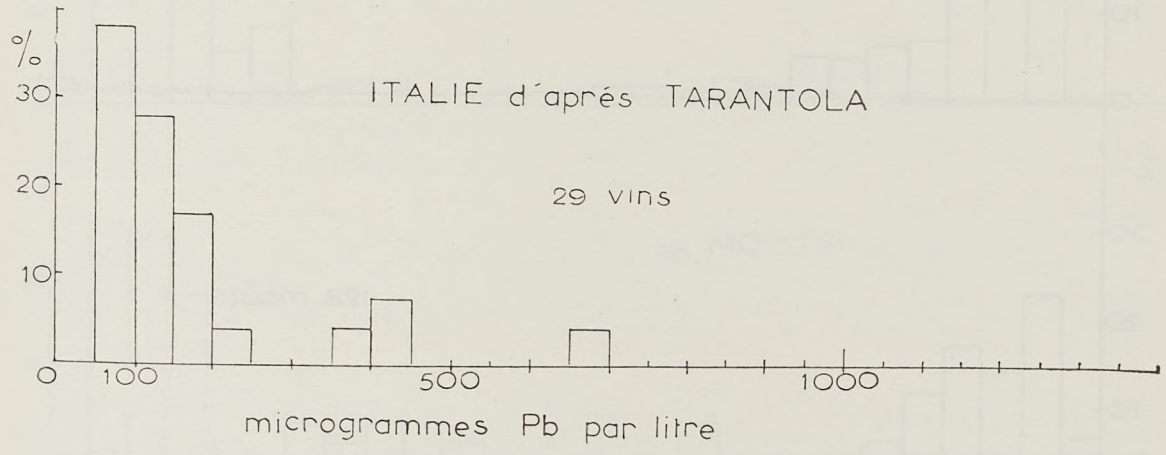
				Plomb en microgrammes par litre
Vin de liqueur			1945	400
Mistelle française			1947	440
Mistelle française	16°		1959	35
Mistelle italienne	17°		1959	60
Muscat Samos			1959	75
Vin viné blanc Vermouth		14°	1959	175
		14°	1959	130
		20°	1959	200
		18°	1959	40
		18°	1959	150
		17°	1959	60
		17°	1959	75
		16°	1959	75
Vin de Quinquina		14°	1954	350
—	—	22,7°	1954	410
Vermouth		X	1951	300
—		Y	1952	400
—		Z	1952	1 300
—		Z	1952	1 050
—		Z	1953	100
—		Y	1953	300
—		Y	1953	350
—		Y	1959	275
Vermouth	Y	18°	1959	50
		18°	1959	25
		19°	1959	100
		19°	1959	75
		18°	1959	275
		18°	1959	280
Vermouth rouge	Y	16°	1959	150
	Y	17°	1959	250
Vermouth blanc	Y	18°	1960	300
—	—	18°	1960	350
—	—	18°	1960	380
—	—	18°	1960	125
—	—	18°	1960	250
—	—	18°	1960	225



Alcools et eaux-de-vie

	Plomb en microgrammes par litre
	—
Alcool à 96° rectifié	25
Alcool à 82° non rectifié	25
Alcool à 85° non rectifié	25
Alcool à 95° rectifié	25
Eau de vie 1953	700
— d° —	700
— d° —	230
— d° —	70
— d° —	300
Eau de vie 1954	75
Eau de vie 1957	40
Eau de vie 1956	170
— d° —	60



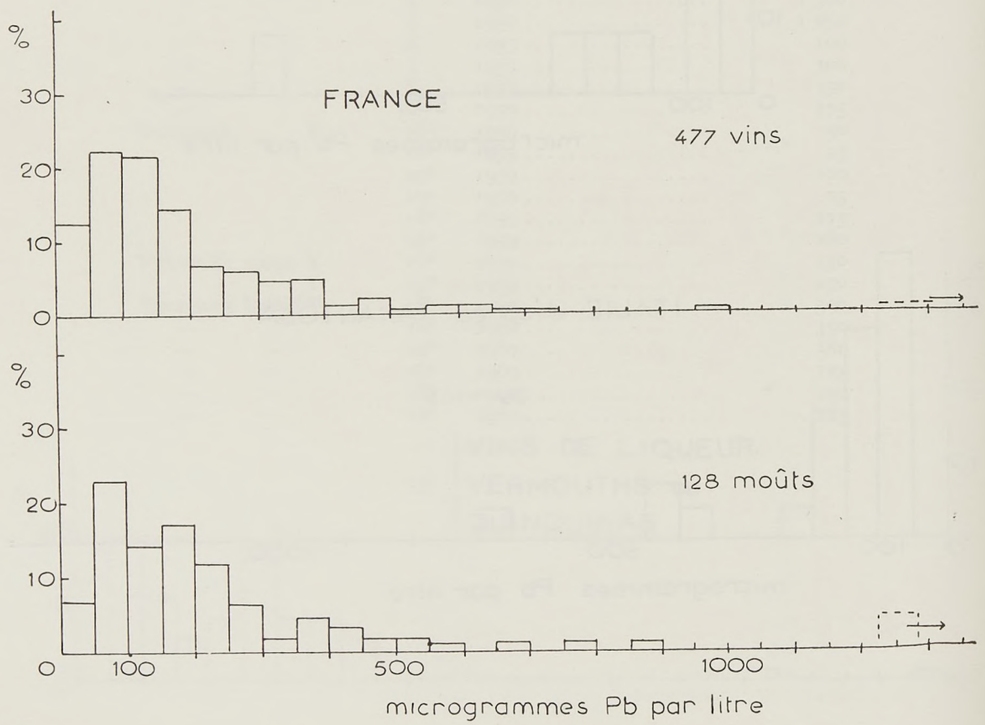


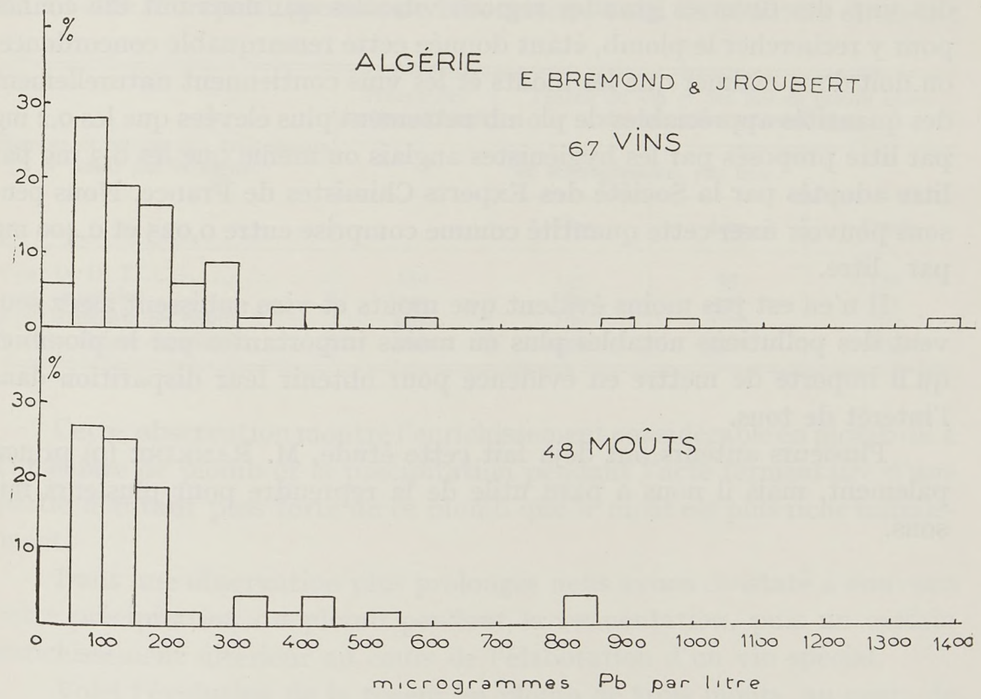
Répartition des vins d'après leurs teneurs en plomb.

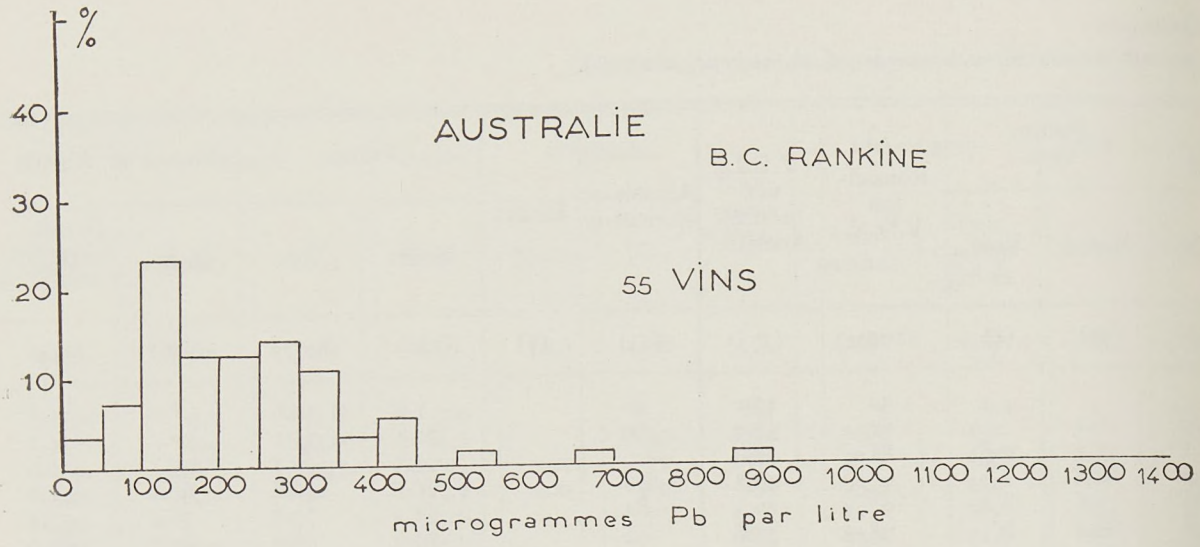
Fréquences rapportées à 100 échantillons.

Teneurs exprimées en microgrammes de plomb par litre (Chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'échantillons analysés).

Teneurs inférieures ou égales à	Alsace		Anjou	Bordelais		Bourgogne	Champagne		Loire	Midi	Poitou 1953-1955		Poitou 1956		Roussillon V.D.N.	V.D.L. vermouths Apéritifs	Alcools et spiritueux	Divers	France		France et Algérie	
	Moûts	Vins	Vins	Moûts	Vins	Vins	Vins naturels	Vins champagnisés	Moûts	Moûts	Moûts	Vins	Moûts	Vins					Moûts	Vins	Moûts	Vins
	(34)	(22)	(38)	(10)	(10)	(15)	(29)	(46)	(20)	(12)	(15)	(20)	(37)	(4)	(100)	(37)	(13)	(2)	(128)	(477)	(176)	(544)
50 ..	14,7	31,8	7,9			6,7		4,3		33					32	13,1	46		7,0	12,6	8,0	11,5
100 ..	79,4	91,0	36,9		30	13,4	27,6	13,0		50		25	16,2		62	32,0	69		30,4	35,1	32,4	34,2
150 ..	88,2	95,5	57,9	30	70	60,0	55,2	23,8			6,7	35	43,2	100	85	42,8			44,5	56,7	49,5	56,9
200 ..	94,2	100	73,7	100	80	80,0	65,5	41,2	5	58	20,0	50	64,8		96	48,1	76		61,7	70,8	67,1	71,0
250 ..			81,6		90		72,4	58,6	15	75	26,7	65	75,6		97	56,3	84		73,4	77,5	76,2	77,5
300 ..	97,0		84,2			86,7	85,2	71,6	55	83		70	86,4		98	72,6	92		79,6	83,4	80,7	83,6
350 ..			89,5		100	100	89,7	86,8	65			80	89,1		99	80,8			81,2	88,0	83,0	87,8
400 ..	100		100				96,7	93,4	70	92		85	91,8			88,9			85,9	92,8	87,0	92,3
450 ..								95,6	85				94,5			94,4			89,0	94,1	90,4	93,7
500 ..							100	97,8	95	100	33,3	90			100				90,6	96,2	91,5	95,5
550 ..								100	100		46,7								92,2	96,6	93,2	95,9
600 ..													97,3						93,0	97,4	93,8	96,8
650 ..												95								98,2		97,5
700 ..											53,3								93,8	98,6	94,3	97,9
750 ..												100					100			98,8		98,0
800 ..													100						94,6		94,9	
850 ..																					96,0	
900 ..											60,0								95,2		96,6	98,2
950 ..																				99,4		98,9
1 000 ..																						
> 1 000 ..											100					100			100	100	100	100







4° Si l'on compare nos divers résultats à ceux de nos devanciers qui ont étudié les vins d'autres régions viticoles et que nous avons rapportés ici sous forme de graphiques de fréquence, on est frappé par la grande analogie de ces graphiques. Ce fait ne peut être l'effet de pollutions accidentelles qui se produiraient partout d'une manière aussi remarquablement identique.

Il faut en conclure que les moûts contiennent naturellement des quantités appréciables de plomb.

Étant donnés les soins qui ont entouré le prélèvement des moûts et des vins des diverses grandes régions viticoles qui nous ont été confiés pour y rechercher le plomb, étant donnée cette remarquable concordance, on doit donc estimer que les moûts et les vins contiennent naturellement des quantités appréciables de plomb nettement plus élevées que les 0,2 mg par litre proposés par les hygiénistes anglais ou même que les 0,3 mg par litre adoptés par la Société des Experts Chimistes de France. Nous pensons pouvoir fixer cette quantité comme comprise entre 0,025 et 0,400 mg par litre.

Il n'en est pas moins évident que moûts et vins subissent assez souvent des pollutions notables plus ou moins importantes par le plomb et qu'il importe de mettre en évidence pour obtenir leur disparition dans l'intérêt de tous.

Plusieurs auteurs ont déjà fait cette étude, M. Rankine (9) principalement, mais il nous a paru utile de la reprendre pour plusieurs raisons.

VI. — CAUSES D'APPORT DE PLOMB AUX VINS.

1° Traitement du vignoble par un sel de plomb utilisé comme pesticide et effet de la fermentation.

Autrefois, c'est-à-dire entre 1925 et 1944, on a employé assez largement les pulvérisations plus ou moins tardives des vignes et des grappes par des arséniates di ou triplombiques pour exterminer les insectes ampélophages. Cet arséniate était préféré à l'arséniate de calcium dans l'espoir qu'il serait moins soluble que ce dernier dans le moût, ce qui est faux. Ces traitements sont actuellement interdits après la véraison et ils sont actuellement remplacés par l'utilisation des insecticides de synthèse beaucoup moins toxiques.

Quels sont les effets de l'arséniate de plomb sur la teneur du moût et du vin en plomb? Voici une première observation datant de 1950 :

Un vin rouge provenant d'un vignoble du Vaucluse, traité tardivement à l'arséniate de plomb, contenait 2,4 mg de plomb et 0,15 mg d'arsenic par litre. Ce vin fut retiré de la consommation.

MM. Françot et Geoffroy nous ont envoyé des moûts de petits vignobles expérimentaux, plantés en Pinots, qu'ils ont traités tardivement à l'arséniate de plomb ou aux insecticides D. D. T. ou parathion. Les moûts ont été mis à fermenter séparément après expression du raisin à l'aide d'un petit pressoir de laboratoire. Voici les résultats obtenus :

Nombre et nature des traitements subis par la vigne	Teneur des moûts en plomb	Teneur du vin et des lies en plomb après fermentation et soutirage.		
	en microgrammes par litre.			
		Vins	Lies	Total
2 par D. D. T.	150	105	65	170
2 par parathion	140	75	100	175
2 par arséniate de plomb	3200	190	2720	2910
3 par arséniate de plomb	4000	450	3380	3830

Cette observation montre l'enrichissement considérable en plomb dû à l'arséniate de plomb et la précipitation pendant l'acte fermentaire d'une partie d'autant plus forte de ce plomb que le moût est plus riche initialement.

Dans une observation plus prolongée nous avons constaté à nouveau cette précipitation du plomb pendant la fermentation, puis un certain enrichissement ultérieur au cours de l'élaboration d'un vin spécial.

Voici l'évolution de la teneur en plomb de trois moûts, au cours de leur transformation en vin, puis en vin mousseux.

Après mai 1954 le vin a été additionné de la liqueur de tirage qui contenait 540 microgrammes de plomb par litre.

Teneur en plomb exprimée en microgrammes par litre.

Cépage	Moût	Vin nature	Après 2ème soutirage	Prise de mousse	
				avant dégorgeage	après dégorgeage
	Oct. 1953	Déc 1953	Mai 1954	Septembre 1954	Octobre 1954
Chardonnay ...	100	75	150	420	420
Meunier	200	100			
Meunier ..... Vignoble traité à l'arséniate de plomb	2200	175	175	295	240

Pendant la fermentation alcoolique la teneur en plomb a fortement diminué surtout pour le moût le plus riche, mais par la suite cette teneur s'est nettement relevée pendant la prise de mousse.

Nous nous sommes demandés si cette surcharge n'était pas due au verre, mais cette supposition a dû être abandonnée, comme nous l'indiquons plus loin, car aucune des bouteilles pour la fabrication et la conservation des mousseux que nous avons étudiées à ce point de vue n'a cédé de plomb aux liquides acides que nous y avons placés.

Cette précipitation du plomb pendant l'acte fermentaire limite en quelque sorte la teneur du vin en plomb à un chiffre relativement modéré, c'est ainsi qu'un vin d'Alsace provenant de grappes de raisins saupoudrées tardivement avec de l'arséniate de plomb ne contenait que 0,600 mg de plomb par litre avec pourtant 7 mg d'arsenic.

Rankine (9) en 1957 signalait que des raisins tardivement traités à l'arséniate de plomb ont donné un jus de raisin renfermant de 0,22 à 1,22 mg de plomb par litre et que la fermentation de ces moûts a précipité une partie de ce plomb variant de 11 à 41 p. 100 de la quantité initiale avec une moyenne de 30 p. 100 de précipitation dans les lies.

Il y a une cinquantaine d'années Moreau et Vinet (27) avaient trouvé qu'une vendange provenant de vignobles traités à l'arséniate de plomb contenait 1,68 mg de plomb par kg de raisin, mais que le vin qui en était résulté s'était trouvé exempt de plomb. La méthode d'analyse utilisée par ces auteurs n'était pas capable de déceler moins de 0,200 mg de plomb par litre. La réduction observée était de toute façon très importante.

MM. Bremond et Roubert (10) ont fait fermenter un moût dont la teneur en plomb avait été portée à 1,88 mg de plomb par litre et ils ont

observé une précipitation progressive de ce métal pendant la fermentation dont la teneur dans le vin a été réduite à 1,14 mg par litre et même 1 mg par litre dans le vin de lies ; cette perte correspond à une réduction maxima de 47 p. 100.

Il est donc certain que l'arséniate de plomb se dissout dans le jus de raisin en quantité importante, l'acidité de ce liquide suffit pour assurer cette dissolution, mais une partie variable de plomb et d'arsenic est précipitée pendant la fermentation, vraisemblablement sous forme de sulfures. Une quantité importante est également retenue par le corps de la levure comme l'a montré M. P. Genaud (28) et comme Tarantola (13) l'a réobservé en 1958.

Ainsi donc cette perte de métaux pendant la fermentation, bien établie pour le fer, le cuivre et même l'arsenic, est également importante pour le plomb, de 10 à 93 p. 100, avec une réduction moyenne de 30 à 40 p. 100.

Fort heureusement cet apport de plomb est actuellement à peu près inexistant, l'arséniate de plomb étant maintenant abandonné comme insecticide en agriculture et l'arrêté du 16/2/1959 ne l'autorise qu'après les vendanges et jusqu'au début de la véraison.

2° Apport du plomb par les poussières et la terre.

Si l'on ne traite plus les vignobles à l'arséniate de plomb, les raisins n'en restent pas moins exposés au dépôt de poussières ou de terre qui peuvent contenir de petites quantités de plomb naturel.

C'est encore Rankine (9) qui a apporté les données les plus précises. Alors que des raisins non lavés contenaient de 10 à 980 microgrammes de plomb par kg, avec une teneur moyenne de 130 microgrammes, les mêmes lavés avec soin, grain après grain, ne contenaient plus que 10 à 100 microgrammes avec une moyenne de 50 microgrammes par kg. Cette observation très importante montre qu'une part notable de plomb est naturellement contenue dans les raisins, mais qu'une part encore plus forte est étrangère au raisin, bien qu'inévitable, car il ne peut être question de laver les raisins, grain à grain, avant la fermentation.

Les poussières plombiques proviennent-elles de la terre ? Nous avons peu de données à ce sujet. G. Bertrand et Okada (36) ont trouvé 250 mg de plomb dans 1 kilogramme de terre sèche de jardin de l'Institut Pasteur en 1933. Pour notre part nous avons dosé le plomb dans la terre de plusieurs vignobles à des distances variables des routes, ainsi que dans des poussières de routes ou rues plus ou moins fréquentées.

Voici les résultats obtenus :

	Pb total	Pb soluble (1)
	—	—
TERRES DES PYRÉNÉES ORIENTALES :		
Loin de toute route fréquentée :	mg par kg	mg par kg
3 km de Perpignan (ouest)	7,6	7,4
3,5 km de Perpignan (ouest)	3,8	3,3
Environs St Cyprien	3,9	2,8
Trouillas	3,5	3,2
Trouillas	3,8	3,5
Voisinage de routes fréquentées :		
Environs St Cyprien	4,9	4,5
Entrée St Cyprien	5,1	5,1
Entre Perpignan et St Cyprien	8,3	8,2
Entrée de Perpignan (route nationale)	4,8	4,0
TERRES DE L'HÉRAULT :		
Loin de toute route fréquentée :		
Commune de Teyran	11,5	11,0
Commune de Jacou	4,3	
Commune de Castelnau	8,4	7,7
Voisinage de routes fréquentées :		
Entre Montpellier et Fréjorgues :		
à 100 m de l'autoroute (ouest)	15,8	14,4
au bord de l'autoroute (même vigne)	16,1	15,3
à 20 m de l'autoroute	9,8	9,3
au voisinage croisement autoroute et route Carnon	11,0	9
Entre Montpellier et St-Gély du Fesc :		
à 20 m de la route	29,4	27,4
à 100 m de la route (même vigne)	33,2	26,3
Entre Montpellier et Sète :		
à 300 m au nord de la route nationale 113 :	7,0	6,1
Entre Montpellier et Nîmes :		
à 100 m. au sud de la route N. 113 :		
Commune de Vendargues	21,3	9,6
Commune de Mauguio	22,8	8,8
Poussières du bord des routes :		
Entre Montpellier et Vendargues :		
margelle pont du Salaison côté nord	455	
côté sud	37	36
(le vent souffle du Sud depuis 8 jours)		
Balise côté sud	61	61
Bord de l'autoroute de Fréjorgues	7,8	7
Bord de la route de St-Gely du Fesc	8,5	8
Avenue Victor Hugo, Montpellier	74	74
Rue peu fréquentée de la banlieue	31	30
TERRES DE LA LOZÈRE :		
Terre du Bougès (terre de micaschistes, très éloignée de toute circulation automobile).	15,2	6,1

(1) La deuxième colonne de ce tableau indique la quantité de plomb qui s'est dissoute en 24 heures dans une solution à 1 p. 100 d'acide acétique à 35°, un gramme de terre ayant été mis en contact avec 200 ml de cette solution.

L'examen de ce tableau montre que nous avons trouvé des quantités de plomb très appréciables dans toutes les qualités de terre que nous avons analysées, qu'il s'agisse de terrain sédimentaire, argileux, calcaire ou siliceux. La terre du Bougès est une terre de micaschistes, très acide. Ce massif montagneux se trouve à l'est de Florac.

Les gaz d'échappement des moteurs automobiles rejettent dans l'atmosphère des quantités considérables de plomb en particules extrêmement petites, très facilement solubles.

MARQUARDT (29) signale même des teneurs en plomb de poussières urbaines qui ont atteint de 0,2 à 1,2 gramme de plomb par kg de poussières prélevées au centre de Bâle, tandis que dans les quartiers extérieurs, cette teneur était de 0,2 à 0,5 g/kg. Même sur une route de campagne, cet auteur signale la présence de 30 mg de plomb par kg. La poussière que nous avons relevée sur le bord des routes fréquentées ou en pleine ville à Montpellier montre des teneurs analogues. Il ne peut manquer de résulter de cet apport une augmentation de la richesse en plomb des raisins récoltés au voisinage des routes fréquentées.

Mais indépendamment de toute circulation automobile, l'apport dû à la terre ne doit pas être négligé comme M. RANKINE l'a montré le premier. Cet apport peut atteindre 10, 20 ou 100 microgrammes par litre de vin, car ce plomb est très facilement soluble dans un liquide faiblement acide comme une solution d'acide acétique, qui n'est pas plus acide que le moût de raisin.

3° Cuves de fermentation et de conservation des vins.

MM. BREMOND et ROUBERT (10) ont observé au cours de leurs essais que les vins obtenus en cuve de ciment soit à l'École Nationale d'Agriculture de Maison Carrée, soit à El Bordj en Oranie, étaient nettement plus riches (265 et 65 µg de plomb) que ceux obtenus en cuve de matière plastique (120 et 35 microgrammes par litre). Ils estiment donc « que cet enrichissement possible par le ciment sera variable avec l'origine du ciment et les traitements reçus par les parois des vaisseaux vinaires ».

Pour notre part nous avons analysé quelques échantillons de ciment vendu à Montpellier et originaire de Frontignan, de Beaucaire ou du Teil et nous n'y avons pas trouvé de plomb (moins de 100 microgrammes par kg). Par contre nous avons trouvé 330 mg de plomb par kg [1] de fluosilicate de magnésium produit employé pour durcir le revêtement interne des cuves de ciment et les rendre moins attaquables par le vin. MM. SUDREAU et CASSIGNARD (30) ont montré récemment que le vin était susceptible de dissoudre des quantités notables de fluor malgré des rinçages

[1] Un autre échantillon contenait 410 mg de plomb par kg.

soignés et prolongés. Nous avons pu examiner la teneur en plomb de vins qui ont été mis en contact avec du ciment fluaté par le fluosilicate de magnésium précité, grâce à l'obligeance de M. VIVIEN, directeur de l'Institut technique du vin de Montpellier, qui a organisé cette expérimentation. Des cubes de ciment de 2 cm de côté (surface totale 24 cm^2) ont été traités de diverses manières puis mis en contact avec 1 l de vin. La proportion surface du cube/volume du vin est voisine de celle qui est réalisée dans une cuve de 300 hl.

Le tableau suivant montre l'enrichissement qui résulte de cet apport, il est relativement considérable.

1re *expérience.*

Teneur initiale du vin 50 microgrammes par litre.

Teneur du vin après contact avec un cube de ciment imprégné une seule fois de fluosilicate de magnésium, sans rinçage ultérieur : 75 microgrammes.

Teneur du vin après contact d'un cube imprégné une seule fois de fluosilicate et rincé à l'eau longuement : 60 microgrammes.

2e *expérience.*

Teneur initiale du vin : moins de 25 microgrammes par litre.

Teneur du vin après contact d'un cube de ciment non traité au fluosilicate : 25 microgrammes par litre.

Teneur du vin après contact d'un cube de ciment imprégné trois fois de fluosilicate de magnésium, non rincé : 75 microgrammes par litre.

Teneur du vin après contact d'un cube de ciment traité cinq fois au fluosilicate de magnésium, non rincé : 125 microgrammes par litre.

Teneur du vin après contact d'un cube de ciment traité cinq fois au fluosilicate de magnésium et rincé longuement à l'eau : 100 microgrammes par litre.

3e *expérience.*

Teneur initiale du vin : 125 microgrammes par litre.

Teneur du vin après contact d'un cube de ciment traité à saturation par du fluosilicate de magnésium par trempage prolongé, sans rinçage ultérieur : 280 microgrammes par litre.

Teneur d'un vin après contact d'un cube semblablement saturé de fluosilicate de magnésium avec rinçage prolongé à l'eau : 250 microgrammes par litre.

Teneur d'un vin après contact d'un cube semblablement saturé de fluosilicate de magnésium avec lavage à l'eau acidulée par 5 g d'acide tartrique par litre : 350 microgrammes par litre.

Ces expériences montrent combien il est nécessaire de n'employer que des fluosilicates exempts de plomb pour cet « affranchissement ».

On peut d'ailleurs se demander s'il est judicieux d'employer le fluosilicate pour l'affranchissement des cuves de ciment, car le fluor du fluosilicate calco-magnésien peut se dissoudre dans le vin comme l'ont signalé Sudreau et Cassignard (30), mais c'est là une question différente qu'il ne convient pas d'aborder ici.

Même l'acide tartrique, produit non toxique, employé lui-même très souvent pour cet affranchissement pourrait apporter du plomb si on ne le choisit pas pur. Deux échantillons d'acide tartrique pour œnologie contenaient 48 mg de plomb par kg pour l'un, 60 mg de plomb par kg pour l'autre. Ces doses sont importantes et il faudrait proscrire de tels produits pour le traitement des vendanges ou même pour le traitement des cuves devant contenir le vin.

Nous nous sommes demandé si une autre cause d'apport de plomb ne pourrait pas être le tartre déposé par une vendange ou un vin relativement riche en plomb. Ce plomb ne pourrait-il pas se dissoudre dans les vins qui y seraient ultérieurement stockés? Dans le cas des vins étudiés par MM. Bremond et Roubert cette cause d'enrichissement ne peut être retenue, car les cuves utilisées n'avaient jamais contenu de vendange de vignobles traités à l'arséniate de plomb.

Nous avons du moins dosé le plomb dans le tartre déposé dans diverses cuves et foudres de conservation de vin prélevé dans le Roussillon en 1957. Voici les teneurs observées.

Teneur du tartre trouvé à l'intérieur de diverses cuves en ciment : 200-100-300-900-400-400-60-60-50 mg par kg de tartre.

Teneur du tartre prélevé dans des foudres de bois : 200-30-1 mg/kg.

Teneur du tartre prélevé à l'intérieur de bouchons de cuivre : 20-50-160 mg/kg.

Teneur du tartre prélevé à l'intérieur d'un robinet de cuivre : 100-193 mg/kg.

La teneur moyenne des tartres prélevés dans cette région s'élève à 220 mg par kg de tartre. Cette teneur est beaucoup plus élevée que la teneur du vin en plomb, si elle est rapportée à l'extrait sec (10 mg Pb/kg extrait sec).

Tous les tartres analysés contiennent donc une proportion quelquefois élevée de plomb. Ce plomb ne provient pas d'insecticides à base d'arséniate de plomb, car ce produit n'a pas été employé dans les vignobles de cette région depuis 15 ans et les cuves dans lesquelles on a fait le prélèvement sont des cuves de stockage et non de fermentation.

Ce plomb provient du plomb entraîné dans le tartre pendant le vieillissement, et on observe simultanément un certain appauvrissement en plomb pendant une longue période de stockage.

D'une manière semblable les lies contiennent plus de plomb que les vins limpides dont elles sont issues. C'est ainsi qu'un vin de 14° contenait après trois mois de repos 120 microgrammes de plomb par litre, tandis que le vin du fond constituant la lie en contenait 550.

Un vin viné à 23°, élaboré en vermouth, après macération des plantes et repos, a contenu 175 microgrammes de plomb par litre de vin limpide. Les lies ont été filtrées, le filtrat a contenu 300 microgrammes de plomb par litre et la lie en pâte à 50 p. 100 d'eau renfermait 6,85 mg de plomb par kg.

4° Apport de plomb par le métal des robinets, pompes, tuyaux, etc...

Les robinets, cylindres et pistons des pompes, raccords filetés, bouchons métalliques, sont en général en bronze ou en laiton fondu.

Voici la teneur en plomb des divers objets qui ont été en notre possession :

Bouchon fileté en laiton	3,6 g par kg
Bouchon fileté en laiton	60 g —
Corps d'un robinet en laiton	62 g —
Boisseau du même robinet	56 g —
Bouchon fileté en laiton	38 g —
Tuyau plongeur en laiton	6 g —
Robinet de cuve corps du robinet	7,2 g —
boisseau du robinet	1,27 g —
Clapet de cuve	2,36 g —
Robinet de filtre	1,31 g —
Petit robinet dégustateur	3,32 g —
Soudure ayant servi à la réparation de ce robinet	27,7 g —
Robinet de foudre	2,79 g —
Robinet de cuve	1,65 g —
Robinet de filtre à lie	(non décelé)
Cuivre rouge de tuyauterie	0,062 g —
Cuivre rouge de tuyauterie	1,06 g —
Cuivre de tuyauterie	(non décelé)

A part le cuivre rouge, tous ces métaux sont plus ou moins riches en plomb, il s'agit de laiton le plus souvent et ce laiton provient quelquefois de vieux métaux de récupération.

Le plomb contenu dans ces alliages cuivreux peut-il se dissoudre dans le vin?

Du vin rouge fut placé dans le corps du robinet contenant 7,2 g de plomb/kg. Ce vin contenait initialement 360 microgrammes de plomb par litre. Après 24 heures cette teneur était portée à 892 et après 120 heures à 1 680 microgrammes par litre.

Une autre expérience fut faite avec un vin rouge contenant initialement 175 microgrammes de plomb par litre ; après 9 jours de séjour de ce vin dans le robinet, sa teneur a atteint 2 800 microgrammes. La dissolution du plomb dans le vin dépend évidemment du rapport volume de vin/surface de métal, ce rapport atteignait dans cette expérience 0,76 ml/cm^2. En plongeant pendant la même durée une partie du robinet

dans un demi litre de vin placé dans un vase, la teneur du vin n'a atteint que 1 000 microgrammes par litre (rapport volume/surface = 1,95 ml/cm²).

Une expérience semblable a été faite avec le petit robinet dégustateur contenant 3,32 g de plomb/kg. Une petite quantité de vin fut alors en contact avec la surface intérieure du robinet ; en 8 jours la teneur du vin a atteint 4 000 microgrammes par litre (rapport volume/surface = 0,064 ml/cm²).

En plongeant ce même robinet dans un quart de litre de vin, la teneur du vin en plomb a atteint 800 microgrammes par litre au bout de 9 jours (rapport volume/surface = 4,6 ml/cm²).

Nous avons également examiné une machine à boucher dont les mâchoires servant à comprimer le bouchon avant son introduction dans le goulot de la bouteille étaient en bronze. Ce bronze contenait 0,21 g de plomb par kg, ce qui est relativement peu. Or, le vin qui s'échappe en petite quantité de la bouteille au moment de l'introduction brutale du bouchon comprimé et qui est recueilli dans une cuvette collectrice, contenait 4 760 microgrammes de plomb par litre dont 3 000 à l'état dissous et 1 176 à l'état de suspension. Ce vin contenait en outre 19,6 mg de cuivre par litre. Le frottement des deux pièces de bronze, humectées de vin, ne peut que faciliter la dissolution du métal dans ce vin. On voit combien importante peut être cette dissolution du plomb à partir d'un métal qui en est pourtant assez pauvre.

Rankine (9) a observé que par simple séjour du vin de Xérès sec dans le corps de pompe de divers modèles, la teneur en plomb a pu atteindre de 2,5 à 4,5 mg par litre au bout de 3 h 1/2 seulement et cela sans que la pompe fonctionne.

Bonastre (18) a observé que le simple passage d'un vin dans une pompe de bronze a porté sa teneur en plomb de 150 à 250 microgrammes par litre.

Rankine (9) a mis en contact, une demi-heure, 21 types de vins avec la même quantité d'un laiton plombeux présentant une surface de 6,9 cm². Cet alliage contenait 80 p. 100 de cuivre, 5 p. 100 d'étain, 5 p. 100 de zinc et 5 p. 100 de plomb.

Dans tous les cas le vin s'est beaucoup enrichi en plomb, la teneur moyenne passant de 250 à 980 microgrammes par litre. Une teneur de 1 620 microgrammes de plomb a même été atteinte dans le cas d'un muscat tartriqué et sulfité particulièrement agressif pour le métal. D'après cet auteur l'augmentation est plus élevée pour les vins doux que pour les vins secs.

5° Apport de plomb par les soudures et les étamages.

Les objets étamés ou soudés peuvent être une cause d'apport très importante si le métal n'est pas de l'étain pur. L'arrêté du 28 juin 1912

interdit d'une façon formelle de placer toutes les boissons ou denrées alimentaires en contact direct de récipients, ustensiles, appareils étamés ou soudés avec de l'étain contenant plus de 1/2 p. 100 de plomb et moins de 97 p. 100 d'étain.

Cette interdiction est absolument nécessaire et une observation récente nous le prouve une fois de plus. Un chauffeur de camion avait fabriqué lui-même une gourde avec de la tôle qu'il avait étamée et soudée avec de la soudure des plombiers à 33 p. 100 d'étain et 67 p. 100 de plomb. Cette gourde d'une capacité de 2 l lui servait au transport du vin destiné à sa consommation personnelle. Il fut atteint au bout de quelques semaines d'emploi de ce récipient d'une crise grave de saturnisme dont l'origine fut difficile à trouver. Le vin transporté dans cette gourde contenait au moment de sa consommation 5 mg de plomb par litre. Le séjour du vin dans une telle gourde ne dépassait pourtant pas quelques heures.

Lorsque l'on met du vin dans un appareil ou un objet de cuivre ou d'acier inoxydable présentant des points de soudure à l'aide d'un alliage plombifère c'est le plomb qui se dissout.

Rankine (9) signale dans le même ordre d'idées que le séjour durant une heure de 300 ml de vin dans un tube de laiton de 2,5 cm de diamètre présentant une partie soudée a porté sa teneur en plomb de 290 à 1 160 microgrammes par litre.

Il ne faudrait tout de même pas croire que tout ce qui est étamé contient nécessairement du plomb. Nous avons examiné des anneaux de chaîne en fer étamé utilisés en Anjou pour faciliter le pressurage des marcs ; aussi bien sur des chaînes neuves que sur des chaînes usagées, nous n'avons pas pu déceler de plomb, l'étain utilisé contenait donc moins de 1 mg/kg. Toutefois nous avons trouvé un anneau de chaîne neuve dont l'étamage contenait 150 mg de plomb/kg. Cela n'est pas négligeable.

Un broc en acier inoxydable avait été réparé par soudure à l'étain. En laissant 24 heures en contact du vin avec la partie soudée, sa teneur s'est légèrement accrue passant de 125 à 145 microgrammes/kg.

On voit l'importance de ce facteur et avec quel soin il convient de surveiller les plombiers et mécaniciens qui réparent tous les objets et appareils utilisés en œnologie.

6° Apport de plomb par les tuyaux de caoutchouc et objets de matière plastique.

Le caoutchouc a déjà été signalé par de Almeida comme pouvant apporter du plomb par sa charge. MM. Bremond et Roubert (10) ont fait la même observation sur du caoutchouc rouge et du caoutchouc noir

vieux, un vin contenant 295 microgrammes/litre, renfermait 360 microgrammes après 24 heures de séjour dans ces tuyaux.

RANKINE (9) a fait la même observation : alors qu'un caoutchouc rouge neuf ne cède pas de plomb, un caoutchouc rouge vieux de 7 ans a fait passer la teneur du vin qui y a été placé durant 84 heures de 60 à 200 microgrammes/litre. Cette teneur est passée à 440 microgrammes dans le cas d'un autre tuyau de caoutchouc vieux de 22 ans. Au cours d'une autre expérience durant laquelle le vin n'est resté que 2 h 1/2 en contact, dans un tuyau caoutchouc rouge vieux de 6 ans, la teneur du vin en plomb est passée de 320 à 460 microgrammes/litre.

Pour que le caoutchouc cède du plomb il faut d'abord qu'il en contienne ; nous avons analysé les charges de quelques tuyaux prélevées en Bourgogne, en Anjou ou en Provence. Un de ces tuyaux contenait 26 mg de plomb par kg de caoutchouc et celui-ci laissait 53 p. 100 de cendres ce qui montre l'importance des charges minérales que l'on intègre dans la gomme. Un autre tuyau contenait 21,6 mg de plomb/kg de caoutchouc sur les 58,5 p. 100 de charges minérales. Enfin un troisième échantillon contenait 90 mg de plomb/kg pour une charge de 55 p. 100.

Ce plomb ne peut passer dans le liquide que l'on fait circuler dans un tuyau que lorsqu'il est vieux, fendillé ; il présente alors une grande surface et il devient poreux.

Les matières plastiques dont l'emploi se généralise sont, elles aussi, quelquefois chargées en plomb ; soit comme charge minérale, soit comme adjuvant ou même comme plastifiant (stéarate de plomb).

Dans un tube d'afcodur, qui est rigide, nous n'avons pas décelé de plomb, de même que dans une autre matière plastique flexible.

Le polythène ne contient lui non plus pas de plomb, car ce produit est plastique sans plastifiant.

Par contre nous avons analysé un tube de matière plastique rigide, opaque, blanche, où nous avons trouvé 1,84 g de plomb par kg. Dans un autre tube de matière plastique transparente, souple, nous avons trouvé 3,23 g de plomb/kg. Ayant fait séjourner pendant 9 jours du vin dans ce tuyau, nous avons observé qu'il s'était enrichi en plomb, sa teneur passant de 175 à 600 microgrammes par litre.

Un troisième tube de matière plastique souple, utilisé dans une cave, contenait 45,8 mg de plomb/kg.

7° Apport de plomb par les mastics utilisés en œnologie.

La paraffine plus ou moins plastifiée par de la vaseline, utilisée pour les obturations provisoires de fuites et pour faire les joints des portes de cuves a été trouvée exempte de plomb dans trois échantillons. Les mastics et les suifs utilisés dans le même but dans les caves pourraient-ils

être une cause d'apports? Trois échantillons de mastic rouge prélevés en Bourgogne ou dans le Midi laissaient 75 p. 100 de cendres et ont contenu les quantités suivantes de plomb : 130-14 et 1 mg de plomb par kg. Un échantillon de mastic blanc, opaque, laissant 63,5 p. 100 de cendres contenait 25 mg de plomb par kg.

Cette cause d'apport paraît minime étant donné que la surface offerte au vin par les joints ainsi mastiqués est généralement très petite.

8° Apport de plomb par les émaux et les peintures

Les émaux vitrifiés pourraient être une cause d'apport importante s'ils sont riches en plomb.

C'est ainsi que l'émail d'un tube de cuivre contenait 166,7 mg de plomb/kg, l'émail d'une autre fabrication en contenait 2,13 g/kg. Après séjour de 9 jours d'un vin dans ce dernier tuyau, sa teneur en plomb est passée de 175 à 1 000 microgrammes/litre.

Après 24 heures de contact avec une cuvette émaillée d'un filtre à plaque, la teneur d'un vin rouge est passée de 125 à 150 mg par litre. Nous n'avons pu disposer de cette cuvette pour doser le plomb dans l'émail.

Est-il besoin de démontrer que les peintures peuvent être une cause d'apport plombique importante?

L'emploi de peintures à l'huile antirouille à base de minium, interdit par l'arrêté du 28 juin 1912, est pourtant assez souvent constaté dans les caves de vinification, ou pour protéger des récipients métalliques utilisés pendant les vendanges. Les peintures à l'huile sont toujours plombifères par leur siccatif ; toutes ces peintures devraient être remplacées par des enduits à base de résine naturelle ou synthétique avec un pigment insoluble dans le vin : carbone, sulfate de baryum, lithopone, ocre, oxyde de titane.

Nous avons constaté que dans la peinture d'un égrappoir centrifuge en fer il y avait 16,7 mg de plomb/kg. Dans la peinture du conquet d'une bascule nous avons décelé 385 mg de plomb/kg. Le moût initial contenait 25 microgrammes de plomb par kg lorsqu'on le prélevait dans la vendange avant ces deux appareils. Après passage dans ces deux appareils cette quantité était portée à 50 microgrammes bien que ce passage ait été très court ; il y a donc une appréciable augmentation due à cette seule origine.

9° Apport de plomb par les bouteilles.

Nous nous sommes demandé si les bouteilles ne pourraient être une cause d'apport de plomb appréciable. En général les bouteilles sont pratiquement exemptes de ce métal. 9 bouteilles de verre blanc, vert ou vert

foncé de type courant pour vin mousseux ou vin ordinaire de diverses fabrications françaises, n'ont pas cédé de plomb à l'acide acétique à 5 p. 100 durant trois mois ou même à l'acide nitrique à 2 p. 100 durant 10 jours. L'apport de plomb fut inférieur à 1 microgramme par litre. Même des bouteilles non rincées, arrivant directement de la verrerie, n'ont pas cédé de plomb à l'acide dilué.

Nous avons pourtant trouvé une bouteille de verre blanc d'un quart de litre qui a cédé au vin que nous y avons placé assez de plomb pour que sa teneur passe de 75 à 500 microgrammes/litre. Ce verre ne cédait pas de plomb à l'eau distillée. Ce verre était d'ailleurs d'un mauvais aspect, bulleux et il avait été fabriqué en 1942 vraisemblablement avec des déchets d'origines diverses.

Le verre à bouteille ne paraît être une cause d'apport plombique que d'une façon exceptionnelle.

10° Apport de plomb par les produits œnologiques.

Nous avons déjà signalé que de l'acide tartrique pour œnologie renfermait une fois 48 mg, une autre fois 60 mg de plomb/kg. Ce n'est pas une règle d'ailleurs, car d'autres échantillons n'en ont contenu que 2 et 3 mg/kg.

Quatre échantillons de bentonite d'origines diverses vendus pour collage du vin ont renfermé 9,9-13,7-17-49 mg de plomb par kg. Un vermouth traité par cette dernière bentonite a vu sa teneur passer de 600 à 640 microgrammes par litre.

Une caséine pour œnologie contenait 10 mg de plomb par kg. Une colle liquide utilisée en œnologie renfermait 0,800 mg de plomb par litre, elle contenait 200 g de protéine par litre.

L'alcool de vinage n'apporte généralement pas de plomb, nous avons rapporté quelques analyses dans nos tableaux précités.

Le ferrocyanure de potassium peut-il apporter du plomb ou peut-il en enlever? M. Bonastre (18) estime que le ferrocyanure ne peut enlever le plomb qu'à la condition d'ajouter un excès de ferrocyanure. Nous avons essayé ce traitement et nous avons constaté que le ferrocyanure utilisé sans excès n'enlève pas la moindre trace de plomb.

MM. Gilbert et Grohmann (14) en basant leur procédé de dosage du plomb sur la plus grande insolubilité des ferrocyanures de fer, de cuivre, de zinc, affirment et prouvent que le ferrocyanure de potassium même en excès ne peut précipiter le plomb en solution plus diluée que quelques milligrammes par litre.

Le traitement des vins par résine échangeuse de cations n'a pas diminué la teneur en plomb d'après MM. Rankine (9) et Bonastre (18), mais ce dernier auteur a observé que l'emploi du ferrocyanure de fer fixé

sur cellite comme échangeuse de cation lourd, s'était révélé très efficace pour déplomber le vin. Cette observation est peu explicable étant donné ce qui a été observé sur l'inefficacité du collage au bleu classique pour enlever le plomb.

Les filtres en carton d'amiante ou en cellulose peuvent-ils céder du plomb, comme ils cèdent souvent calcium et magnésium?

Un carton filtrant pour œnologie de fabrication française laissait 28,3 p. 100 de cendres ce qui indique sa teneur en amiante et en cellulose tandis qu'un carton filtrant de fabrication allemande laissait 32 p. 100 de cendres. Le premier de ces cartons pouvait céder à un liquide acide (acide acétique N) 1,2 mg de plomb par kg, le second 0,99 mg de plomb par kg.

Le papier filtre ordinaire utilisé dans les laboratoires a cédé une quantité notable (8,5 mg de plomb par kg) facilement soluble dans le vin. La pollution qui résultera de l'emploi de ces agents filtrants ne peut être importante que si le volume de vin filtré est petit.

IIo Apport de plomb par les capsules de surbouchage.

Une cause d'enrichissement parfois considérable des vins en bouteille est l'emploi de capsules de surbouchage dites en étain.

Dans toutes nos observations nous n'en avons trouvé qu'une seule qui était en étain fin. Elle se trouvait sur une bouteille de cognac de grande marque. Pour les bouteilles de vin, il est de règle de n'utiliser que des capsules de plomb étamées en surface. Ces capsules sont généralement vernies ou peintes à l'extérieur, mais jamais à l'intérieur ; les producteurs de ces capsules se préoccupent beaucoup plus de la présentation que de l'efficacité.

La surface intérieure est lentement corrodée par le vin qui chemine entre le liège et le verre ou à travers le liège. Les sels de plomb suivent un chemin inverse et arrivent peu à peu à pénétrer dans le vin.

Ce fait a été signalé par M. Burtt (31) à Penang (en Birmanie) en 1947. L'un de nous a fait une étude de ce phénomène avec M. Ferre (5) en 1948. Plus récemment MM. Bergner et Schikorr (32) en 1957 ont étudié attentivement la corrosion des capsules en plomb étamé et le risque qui en résulte pour la santé du consommateur. Plus récemment encore (M. Bonastre) (18) (1959) a réobservé et étudié cette migration lente du plomb dans le vin.

MM. Ferre et Jaulmes (5) ont trouvé en 1948 des doses de plomb s'élevant à 3,6 mg/l après dix ans de séjour en bouteille capsulée, à 2,0 mg de plomb par litre après 15 ans de séjour, et à 0,4 mg de plomb par litre après 35 ans de séjour. La moitié du bouchon qui était en contact avec le vin contenait 54 mg de plomb/kg tandis que la moitié, qui

avait été en contact avec la capsule contenait 4,2 g de plomb/kg. Le liège neuf est pratiquement exempt de plomb (moins de 0,1 mg/kg). Ces bouchons entiers pesaient 4 g et avaient 5 cm de longueur. Il y avait en tout 8,7 mg de plomb dans le bouchon d'une de ces bouteilles.

MM. BERGNER et SCHIKORR (32) ont beaucoup insisté dans leur étude très attentive sur la pollution du vin lorsqu'il passe sur le goulot de la bouteille chargée en sels et oxyde de plomb déposés par la corrosion de la capsule de plomb étamé et ils recommandent l'emploi de capsules dont l'étamage ait une épaisseur plus grande que celle des capsules du commerce actuel. Ils signalent de plus l'intérêt du paraffinage des bouchons pour éviter les échanges entre l'intérieur et l'extérieur à travers le bouchon.

V. — DOSE MAXIMA DE PLOMB TOLÉRABLE

Les causes possibles d'apport de plomb dans le vin sont donc nombreuses, certaines étaient connues, d'autres à peine soupçonnées, ou jugées négligeables. Mais plusieurs petites causes d'apport de plomb en s'ajoutant peuvent faire une somme appréciable. L'absorption répétée de vin même peu riche en plomb peut avoir à la longue un effet toxique regrettable.

Par les travaux de G. BERTRAND (11), de KEHOE (12), de CHAPMAN (33), de CHEFTEL (37) et de bien d'autres, nous savons que les matières alimentaires même non souillées contiennent une petite quantité de plomb. On a pu fixer à 0,2 mg cet apport alimentaire quotidien naturel. On estime par ailleurs que la vie urbaine double au moins cet apport quotidien. Ce plomb supplémentaire provient de l'emploi du plomb dans la distribution de l'eau, de la pollution de l'atmosphère par les poussières plombiques provenant des gaz d'échappement des véhicules automobiles et à d'autres contaminations auxquelles nos contemporains sont exposés par suite du développement des emplois du plomb et de ses composés.

L'expérience montre que cette absorption quotidienne est parfaitement tolérée par tous, mais il ne faut pas qu'elle dépasse certaines limites. Pour BROUARDEL les accidents du saturnisme n'apparaissent qu'à partir de 1 mg par jour. D'autres auteurs fixent cette dose quotidienne à 2 mg (LEGGE et GOADBY (34)). Il est évidemment bien difficile de fixer un seuil défini avec précision. On peut admettre que pour éviter tout danger de saturnisme, la dose de plomb ingérée par jour doit rester inférieure à 0,5 ou à 0,8 mg (R. FABRE (35)).

L'écart entre l'apport alimentaire normal ou habituel et la dose quotidienne pouvant être dangereuse est donc très faible et il est évidemment souhaitable que le vin n'apporte qu'une surcharge plombique aussi

faible que possible. Toutefois il faut remarquer que le vin n'est qu'un aliment accessoire. Il est toxique par son alcool à partir d'une certaine dose quotidienne que l'on a pu fixer à 3/4 de l pour les femmes et 1 l pour les hommes. Une alimentation saine doit donc comporter une quantité de vin inférieure à ces limites. La consommation quotidienne de 3/4 de l de vin contenant au plus 0,6 mg par litre apportera donc tout au plus 0,45 mg de plomb. C'est bien un maximum, mais comme il s'agit d'un maximum il pourrait être accepté.

A titre de comparaison, rappelons que l'on trouve dans le sang normal des doses de plomb comprises entre 0,2 et 0,4 mg par litre. L'eau de ville qui a circulé dans des conduites de plomb contient de 0,04 à 0,2 mg de plomb par litre, dans les pays à eau calcaire où l'emploi de ce métal ne conduit à aucun accident (déterminations personnelles à Montpellier). D'après MONIER-WILLIAMS, on admet que dans l'eau de table 0,3 mg de plomb par litre est sans danger et que 0,5 mg est le maximum tolérable parce que 0,7 devient dangereux. Par mesure de prudence, la limite fixée internationalement pour la teneur en plomb de l'eau de boisson a été ramenée à 0,1 mg/l. Malgré cette limite internationale nous avons constaté que l'eau de pays calcaire ayant circulé dans des conduites de plomb pouvait contenir jusqu'à 0,2 mg de plomb par litre. Pour respecter cette limite internationale, il faudrait donc supprimer l'emploi des tuyaux de plomb pour la distribution de l'eau.

La teneur en plomb du vin peut être fixée notablement plus forte que celle de l'eau, sans inconvénient, car la plupart des gens consomment moins de vin que d'eau. On peut fixer d'ailleurs la teneur de la bière et du cidre à un chiffre intermédiaire entre celle de l'eau et du vin, car on boit facilement plus de bière ou de cidre que de vin.

C'est en vertu de ces diverses considérations que l'un de nous avait pu justifier la dose de 0,6 mg adoptée au Congrès de Rome de la Vigne et du Vin en 1953.

Cette limite a été à nouveau discutée le 13 décembre 1958 par une Commission réunie à la diligence du Service de la Répression des Fraudes à Paris. Après discussion à laquelle ont pris part M. FLORENTIN, TRUFFERT, THOUMAS, PROTIN, FLANZY et l'un de nous, la résolution suivante a été adoptée :

1° Les experts français estiment pouvoir proposer aux experts des autres pays viticoles de demander à l'Angleterre d'adopter la limite de 0,6 mg de plomb par litre de vin, déjà proposée par le Congrès de la Vigne et du Vin de Rome en 1953. Etant données les difficultés du dosage, il apparaît indispensable de prévoir une tolérance de 0,1 mg par litre.

2° De toute façon il convient de chercher à abaisser la teneur des vins au minimum possible et ce dans un délai maximum de 5 ans. Au

cours de cette période des réunions d'experts compétents en cette matière seront provoquées pour examiner les résultats des études entreprises et pour enregistrer les progrès réalisés par la viticulture et le commerce français.

Cette façon de voir a été adoptée en janvier 1959 par la Sous-Commission Internationale d'unification des méthodes d'analyse du vin de l'Office International du vin.

En exécution de la deuxième partie du vœu de la Commission de la Répression des Fraudes, il nous paraît nécessaire d'envisager un certain nombre de mesures réglementaires ou autres pour l'élimination des causes d'apport de plomb dans le vin. C'est l'intérêt même de la santé publique et des producteurs de vin.

Il convient d'attirer sans délai l'attention des producteurs de vin sur la nécessité d'éliminer totalement toutes les causes d'apport plombique, même celles qui paraissent d'importance minime.

Les administrations de la Répression des Fraudes et des Contributions Directes pourraient donner à leurs agents des instructions pour qu'ils veillent à l'exécution stricte des divers décrets, arrêtés et règlements interdisant l'emploi d'objets, produits etc... contenant du plomb dans toutes les industries alimentaires, en particulier le décret du 15 avril 1912 et l'arrêté du 28 juin 1912.

Il paraît nécessaire de prendre de nouvelles mesures réglementaires interdisant certains usages non prévus par les dispositions légales en vigueur actuellement.

Les directeurs de Stations œnologiques, les œnologues, devront entreprendre une campagne d'éducation et de persuasion des viticulteurs, des maîtres de chais, pour que cessent quelques errements actuels et les négligences qui augmentent bien inutilement la teneur des vins en plomb.

Voici les mesures qu'il convient de prendre dans les meilleurs délais :

1° Rappeler l'interdiction d'employer l'arséniate de plomb entre la véraison et la récolte. Ce produit est heureusement presque complètement abandonné en viticulture.

2° Rappeler la nécessité d'une parfaite propreté de toute la vaisselle vinaire : cuves, comportes, seaux, machines, tuyauteries, qui doivent être nettoyés avant et aussitôt après les vendanges.

3° Interdire l'emploi de tuyaux de caoutchouc ou de matière plastique dont la charge contiendrait une quantité appréciable de plomb, 1 mg de plomb par kg pour fixer les idées.

4° N'employer que des produits œnologiques exempts de plomb avec une tolérance au plus égale à celle du Codex.

5° Revêtir tous les appareils de cuivre, de fer, de ciment, d'enduits

ou de peintures sans plomb. Ne pas employer de peinture à l'huile de lin dont le siccatif est généralement à base de plomb. A fortiori rappeler l'interdiction absolue d'employer toute peinture à base de minium, de chromate de plomb, etc... même si cette peinture est recouverte d'une ou plusieurs couches de peinture à base d'autres pigments. Comme cela se fait dans plusieurs régions viticoles, en Alsace notamment, et dans plusieurs pays étrangers, n'utiliser que des laques inaltérables sans plomb pour protéger le fer et éviter sa dissolution dans le vin. Le pigment de ces laques doit être à base de sulfate de baryum, de lithopone, de carbone, ou tout autre pigment insoluble dans le vin et de toute façon exempt de plomb.

Il paraît utile qu'une réglementation soit établie par le Service de la Répression des Fraudes pour le contrôle des peintures, enduits de matières plastiques utilisés en œnologie comme dans toutes les industries agricoles ou alimentaires.

6° Interdire l'emploi des robinets, pompes, tuyaux, etc... fabriqués avec un alliage, laiton ou bronze, contenant une dose notable de plomb. La limite tolérable doit être fixée à un chiffre très bas, de l'ordre du milligramme par kg car nous avons vu avec quelle facilité ces métaux sont dissous dans le vin et lui cèdent leur plomb.

Il faut encourager de toute manière l'emploi de l'acier inoxydable et des matières plastiques sans charge ou plastifiant nocifs pour la partie des appareils venant en contact avec le vin. L'intérieur des boisseaux de robinets, les conduites, raccords et parties non frottantes des pompes devraient être recouverts d'un revêtement adhérent inaltérable comme le font déjà certains fabricants. Toutes ces mesures auraient l'avantage non seulement d'éviter les apports saturnins, mais encore la dissolution du fer ou du cuivre dont on connaît les inconvénients sur la tenue du vin.

7° L'emploi de toute soudure contenant plus de 0,5 p. 100 de plomb doit être rigoureusement proscrit pour l'assemblage des diverses parties et la réparation des entonnoirs, ouillettes, brocs, et tous ustensiles ou machines employés pour la manipulation du vin. Les étamages de ces ustensiles ou appareils doivent être exclusivement faits à l'étain fin (art. 4 de l'arrêté du 28/6/1912). De nombreux prélèvements dans les caves seraient utiles pour vérifier dans quelles mesures cette prescription légale vieille de 48 ans est suivie.

8° Les émaux vitrifiés des appareils et conduites doivent être exempts de plomb.

9° Les filtres en papier, amiante, terres filtrantes, doivent être exempts de plomb. Des vérifications fréquentes paraissent nécessaires.

10° La qualité du verre des bouteilles doit être vérifiée. Ce verre

ne doit pas céder de traces de plomb à une solution d'acide acétique à 2 p. 100 pendant un mois de contact.

11° L'emploi des capsules de surbouchage, en plomb, même étamées, devrait être interdit. Certes la pollution due à cette origine ne se manifeste qu'après quelques années de conservation du vin en bouteille capsulée, mais même si le plomb ne pénètre pas dans le vin parce que la conservation est relativement courte, le vin peut s'enrichir en plomb au moment où on le verse, si on n'a pas la précaution de laver avec beaucoup de soins le goulot de la bouteille avant d'enlever le bouchon de liège.

L'industrie fournit actuellement des capsules d'aluminium ou de matière plastique ne présentant aucun danger. Rien ne s'oppose à ce que l'on proscrive définitivement le plomb dont l'emploi peut avoir des conséquences très fâcheuses dans le cas de longue conservation en bouteilles.

12° La cire à cacheter des bouteilles doit elle aussi être choisie exempte de plomb, comme l'a signalé M. TAVERNIER.

VI. — CONCLUSION

Les diverses méthodes d'analyse utilisant la dithizone donnent des résultats satisfaisants pour le dosage du plomb à condition que les précautions les plus minutieuses soient prises pour assurer la pureté des réactifs et la propreté de la verrerie et pour éviter toute contamination par des poussières plombiques pendant les opérations analytiques.

Les moûts et les vins contiennent naturellement des quantités de plomb appréciables, comprises entre 25 et 400 microgrammes par litre avec un maximum de fréquence entre 100 et 250 microgrammes.

La limite proposée par les hygiénistes anglais de 200 microgrammes par litre correspond aux cas les plus fréquents mais non à la limite maxima. Jusqu'à nouvel ordre il y a lieu de maintenir cette limite à 600 microgrammes par litre, limite encore admissible du point de vue de la santé publique. Cette limite tient compte des pollutions inévitables du raisin avant sa transformation en vin. Bien entendu l'emploi de l'arséniate de plomb en viticulture doit être exclu pendant la période de développement du raisin.

Sous l'action d'un grand nombre de minimes causes d'apport plombique, les doses ci-dessus peuvent être dépassées. Les plus fréquentes sont les objets métalliques soudés ou les alliages contenant de petites quantités de plomb, les peintures, enduits, matières plastiques, émaux vitrifiés contenant des quantités appréciables de plomb ainsi que certains produits œnologiques.

Des mesures très strictes doivent être prises pour que toutes ces causes d'apport saturnin soient éliminées. Il résultera de ces mesures qui

demanderont beaucoup de soin et d'attention, une diminution de la teneur du vin en plomb et à ce seul titre le projet de réglementation de la teneur des vins en plomb, dont le gouvernement anglais a pris l'initiative aura eu un effet salutaire pour la santé publique.

Laboratoire de Chimie Analytique et Toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Montpellier. L'Institut National de la Recherche Agronomique a collaboré et subventionné cette étude ; nous lui exprimons nos vifs remerciements.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Bolotov (M. P.). — *Vop. Pitan*, **8**, 100, 1939, d'après *Chem. Abstr.*, **33**, 6 520, 1939.
(2) De Almeida (M.). — *Anais Inst. Vinho Porto*, 13, 1947.
(3) Monier-Williams (G. W.). — Trace elements in food. Edit. Chapmann et Hall, London, 80-84, 1950.
(4) Jaulmes (P.) et Achard (Mlle S.). — *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **7**, 59, 1948.
(5) Ferré (L. J.) et Jaulmes (P.). — Les capsules en étain plombifère, cause de la présence de plomb dans les vins. *C. R. Ac. Agr.*, **34**, 864-865, 1948.
(6) Achard (Mlle S.). — Dosage toxicologique du plomb par la dithizone. Thèse doc. pharmacie, Montpellier, 1948.
(7) Jaulmes (P.). — Analyse des vins, édit. Poulain, Montpellier, 159-167, 1951.
(8) Rankine (B. C.). — *J. Sci. Food. Agric.*, 576, 1955.
(9) Rankine (B. C.). — *J. Sci. Food. Agric.*, 458-466, 1957.
(10) Bremond (E.) et Roubert (J.). — Le plomb dans les moûts et les vins algériens. Congrès A. F. A. S. Dijon, juillet 1956. *Ann. Écol. nat. Agric. Alger*, novembre 1958.
(11) Bertrand (G.) et Ciurea (V.). — Le plomb dans l'organisme des animaux. *C. R. Ac. Sc.*, **192**, 990-992, 1931.
(12) Kehoe (R. A.), Thamann (F.) et Cholak (J.). — *Journ. Ind. Hyg.*, **15**, 257, 273, 289, 301, 306, 320, 1933.
(13) Tarantola (L.) et Libero (A.). — Microelementi nei Vini : II piombo. *Riv. Vitico. Enolog. Conegliano*, **11**, 47-60, 1958.
(14) Gilbert (E.) et Grohmann (H.). — *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **12**, 300, 1959.
(15) Fischer (H.) et Leopoldi (G.). — *Zeit. Angew. Chem.*, **47**, 90, 1934.
(16) Analytical methods committee. — *Analyst*, **79**, 397, 1954.
(17) Analytical methods committee. — *Analyst*, **84**, 127, 1959.
(18) Bonastre (J.). — Contribution à l'étude des matières minérales dans les produits végétaux, application au vin. Thèse Doct. ès Sc., Bordeaux, n° 91, 1959.
(19) Truffert (J.). — Communication à l'Association internationale de confiserie en juillet 1955 (communication personnelle de l'auteur).
(20) Irving et Butler. — *Analyst*, **78**, 571, 1953.
(21) Porretta (A.), Capuano (G.), Cultrera (R.). — Industria conserve. Station expérimentale pour l'industrie de la conserve alimentaire de Parme, **31**, 1er fasc., 1956.
(22) Bonastre (J.) et Pointeau (R.). — Dosage polarographique des cations lourds dans les vins. *Chim. Anal.*, **39**, 193-196, 1957.

(23) VORONTSOV (R. V.). — *Journ. Anal. Khim.*, **8**, 228, 1953.
(24) JAULMES (P.). — Microdosage du plomb par la réaction à la dithizone. *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 239, 1942.
(25) JAULMES et HAMELLE (Mlle G.). — *Journ. Médecine, Bordeaux*, **134**, 635, 1957.
(26) GAROGLIO (P. G.). — Piombo. La nuova enologia, 1 129-1 132, 1959. Edit. Istituto di Industrie Agrarie, Firenze.
(27) MOREAU (L.) et VINET (E.). — *C. R. Ac. Sc.*, **150**, 787, 1910.
(28) GENAUD (P.). — Les échanges d'ions entre cellules de levures et solutions de nitrate de plomb. *C. R. Ac. Sc.*, **189**, 591-592, 1929.
(29) MARQUARDT (P.). — *Münchener Mediz. Wochenschrift.*, **100**, 580, 1958.
(30) SUDRAUD (P.) et CASSIGNARD (R.). — Enrichissement des vins en fluor par les enduits de cuves à base de fluosilicates. *Vignes et vins*, **77**, 2-4, 1959.
(31) BURTT (A. V.). — Lettre personnelle non imprimée.
(32) BERGNER (K. G.) et SCHIKORR (G.). — *Zeitsch. Lebensm. Untersuch. Forschg.*, **106**, 132, 1957.
(33) CHAPMAN (A. C.) et LINDEN (M.). — *Analyst*, **51**, 548, 1926.
(34) LEGGE (T. M.) et GOADBY (P. E.). — Lead poisoning and lead absorption. London 1912 (d'après MONIER-WILLIAMS (loc. cit.)).
(35) FABRE (R.). — *Leçons de Toxicologie*, **10**, 50, 1945. Édit. Hermann et Cie, Paris.
(36) BERTRAND (G.) et OKADA (Y.). — Sur l'existence du plomb dans la terre arable. *C. R. Ac. Sc.*, **196**, 826-828, 1933.
(37) CHEFTEL (H.) et PIGEAUD (Mlle M. L.). — A propos de la présence de plomb dans les sardines en conserve. *Ann. Fals. Fraudes*, **30**, 10-18-1937.

LA PRÉVISION DE L'ACIDITÉ FIXE DES VINS EST-ELLE POSSIBLE?

PAR

E. NÈGRE, A. DUGAL, et J. M. EVESQUE

Station de Recherches de la Chaire de Technologie,
Centre de Recherches Agronomiques du Midi,
École Nationale d'Agriculture, Montpellier.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Position du problème.

Les facteurs de solubilité de l'acide tartrique en présence de potassium et de calcium.

A. — État actuel de la question.

B. — Définition de la solubilité du tartrate acide de K.

II. — Prévision de la quantité de tartrate acide de K qui cristallisera.

A. — Calcul de la quantité t_n d'acide tartrique, une fois réalisé l'équilibre à n° C.

B. — Détermination de $\frac{s}{c} = t_n\, p_n$ à n°C.

C. — Comparaison de nos résultats avec ceux d'autres auteurs.

D. — Influence des ions autres que les ions tartrates et K, ne provoquant pas la formation de sels insolubles avec ces derniers.

III. — Prévision de l'acidité fixe finale à n°C d'une solution sursaturée en tartrate acide de K, d'un moût ou d'un vin.

1° Absence d'action bactérienne et de constituants solides de la vendange.

2° Cas où intervient la fermentation malolactique.

3° Cas d'une désacidification partielle préalable ou non à la fermentation malolactique.

4° Cas de la vinification en rouge.

5° Choix de la matière première destinée à la concentration des moûts et des vins.

IV. — Application à des moûts de composition connue et aux vins résultant de leur fermentation.

A. — Étude à partir de moûts de teneurs variées en acides organiques et en potasse.
B. — Vinification de vendanges d'origines différentes.
C. — Influence des matières solides.
D. — Influence de la fermentation malolactique sur l'insolubilisation du tartrate acide de K.
E. — Méthodes analytiques utilisées.

V. — Degré de sursaturation des vins.

VI. — Résumé et conclusion.

I. — POSITION DU PROBLÈME.

Parmi les nombreux facteurs contribuant aux caractéristiques du vin, l'acidité fixe occupe une place particulièrement importante.

Sa prévision à partir d'un vin jeune, du moût même dans la mesure du possible, permettrait à l'œnologue de mieux fixer les directives nécessaires pour guider l'élaboration et l'évolution du produit, compte tenu des répercussions que les manipulations autorisées exercent sur la composition de celui-ci et des caractères susceptibles d'être souhaités et acquis.

Elle devrait permettre, en particulier :

1°) De choisir rationnellement sur la base de données plus précises, la méthode de vinification, notamment la dose d'anhydride sulfureux, s'il convient de favoriser ou non la fermentation malo-lactique ou éventuellement même d'acidifier ou de désacidifier les années où cette pratique se trouve autorisée. Le vinificateur se demande souvent, tout au moins dans les régions méridionales, si la chute d'acidité au cours de l'hiver ne risque pas d'être trop grande ; la crainte de ce danger le conduit alors, par précaution, à sulfiter plus qu'il n'est utile. S'il est amené à souhaiter l'action des ferments malo-lactiques, c'est bien aveuglément, sans aucune sécurité.

2°) La prévision de l'acidité permettrait aussi de mieux se rendre compte des traitements à faire subir à un vin et de leurs modalités.

3°) Si l'on arrivait enfin à préciser l'acidité finale du vin, on serait fixé sur la stabilité physico-chimique de la boisson ou sur les risques d'évolution ultérieure à cet égard.

La stabilité biochimique est d'un autre ordre.

Quelles sont les principales causes des variations de l'acidité fixe?

A. — Du moût au vin, l'acidité fixe croît du fait de la levure pour plusieurs raisons, malgré l'utilisation partielle, par celle-ci, de certains acides (malique surtout) :

— formation d'acides fixes (acide succinique surtout à partir de l'acide glutamique et de l'acide acétique, celui-ci produit secondaire de la fermentation ou de la respiration des sucres par la levure) ;

— assimilation d'azote ammoniacal, par la levure.

B. — Du moût au vin, puis au cours de la conservation de celui-ci, l'acidité fixe diminue, mise à part l'action bactérienne, du fait de phénomènes physico-chimiques et chimiques dont le plus important est la cristallisation de tartrate acide de potassium.

Etant donné que, quel que soit le point de départ envisagé, ce phénomène est toujours à considérer, nous allons en étudier, de façon toute spéciale, les facteurs et le moyen d'en prévoir l'importance dans le vin.

Nous serons amenés à tenir compte de l'influence de la levure lorsque nous voudrons essayer de prévoir l'acidité fixe finale du vin, stabilisé à une température donnée.

Les facteurs de solubilité de l'acide tartrique en présence de potassium et de calcium.

A. — Etat actuel de la question.

α) *Facteurs influant sur la solubilité du tartrate acide de K.*

L'acide tartrique est très soluble dans l'eau et dans les solutions hydro-alcooliques, mais sa solubilité est limitée dans le vin — et cela, d'autant plus que le degré alcoolique est plus élevé et le degré centigrade plus faible —, par la présence de potassium et de calcium qui conduit à une cristallisation de tartrate acide de potassium et d'un peu de tartrate de Ca, au cours du refroidissement du vin.

La teneur du vin en cet acide dépend donc de la composition du raisin, des modes de préparation et des conditions de conservation du vin. L'action des microorganismes peut être importante, mais elle ne sera, ici, qu'effleurée.

Laissant de côté, dans ce travail, le calcium, occupons-nous du potassium qui, des deux métaux entrant dans la composition de ces sels, a seul un effet direct sur l'acidité fixe. Cependant, l'insolubilisation du tartrate de calcium a une action indirecte, bien plus faible certes. en diminuant la teneur du milieu en acide tartrique sans modifier ni l'acidité fixe du liquide, ni sa teneur en potasse. La quantité de tartrate acide de K qui précipitera sera, de ce fait, légèrement modifiée.

Ce qui nous intéresse, c'est la composition du vin une fois stabilisé à

basse température ; les lents phénomènes d'estérification et d'oxydation seront supposés négligeables, lors de nos essais de prévision.

Il est bien connu depuis longtemps que la solubilité du tartrate acide de potassium décroît avec la température et lorsqu'augmente la teneur du milieu en alcool (Tables de Chancel (1), de Mosca, de Kissel (2), de Roelofsen (3), dont des extraits sont reproduits dans divers traités (1') (3') (4').

Berthelot et de Fleurieu (1865) (4) avaient reconnu l'influence précipitante de l'acide tartrique d'une part, de la potasse d'autre part, qu'ils utilisèrent au dosage de ces constituants des vins (méthode officielle de 1907). [cf. Jaulmes (5).]

Divers auteurs, Mathieu et Chauvet (1913) (13), Paul (1917) (6), Bohnen (1919) (7), J. Ventre et A. Bouffard (1922) (8) (9), Fonzes-Diacon (1922) (10), Bremond (1937) (11), Tomasset (1955) (12), ont montré l'influence de la teneur du milieu en potassium et en acides autres que l'acide tartrique.

D'après Mathieu et Chauvet (1912-1913) (13) « les variations des acides malique et tartrique ont aussi des influences indirectes non négligeables et de sens inverses sur la teneur des vins en crème de tartre, l'acide malique favorisant la solubilité et l'acide tartrique l'entravant... »

« L'addition d'acide tartrique donne lieu à un accroissement de la crème de tartre par réaction sur les sels de potasse solubles et à une diminution de sa solubilité ; la chute de la crème de tartre résultant de ces actions doit nécessairement varier avec les autres conditions qui régissent sa solubilité, *aussi est-il prudent dans l'addition d'acide tartrique aux moûts de ne pas compter sur une règle trop absolue* ». (1).

Genevois (14) a fait une très intéressante synthèse des travaux de Paul (6) et de Bohnen (7) sur « la solubilité des tartrates de potassium et de calcium dans les solutions alcooliques acides, les moûts et les vins ».

De leurs nombreux et copieux tableaux, il a extrait les résultats susceptibles d'intéresser l'œnologue en en recalculant certains pour les rendre interprétables par les données scientifiques récentes.

Bohnen « est arrivé à ce résultat surprenant, dit-il, que le bitartrate est beaucoup plus soluble en présence d'acides malique et lactique qu'en présence d'acide tartrique seul. Ce résultat avait déjà été indiqué en 1908, d'une façon qualitative, par A. Bouffard (15) et, en 1913, par Mathieu et Chauvet (13).... »

« Les mélanges d'acide malique, d'acide lactique et d'acide tartrique montrent que l'action sur la solubilité du potassium n'est pas additive ; tout ce que l'on peut dire c'est que la solubilité du bitartrate est une fonction croissante à la fois des concentrations en acide malique et

(1) Souligné par nous.

en acide tartrique. *Mais il est impossible de prévoir a priori avec les chiffres publiés, quelle sera la solubilité du bitartrate dans une solution de composition donnée* ». (1)

D'après VENTRE (9) « la solubilité de la crème de tartre dans un moût ou dans un vin est surtout fonction, toutes choses égales d'ailleurs, du rapport qui existe entre les divers acides se trouvant simultanément dans le milieu. »

Partant de quatre solutions contenant la même quantité d'acides tartrique, citrique et succinique, de potassium (ajouté sous forme de carbonate), d'alcool et de glycérol, mais des quantités croissantes d'acide malique et d'un témoin ne contenant, parmi les acides précités que l'acide tartrique, il constate, une fois l'équilibre réalisé, que « la seule variante étant l'acide malique, la solubilité du bitartrate est directement proportionnelle à la concentration de cet acide. »

Dans un important travail, TOMASSET (1954) (12) relate les résultats de son étude sur la solubilité du tartrate acide de K en fonction de la teneur de la solution en alcool, acides tartrique, malique et lactique, et en magnésium ; il s'est attaché à étudier plus particulièrement la teneur des solutions saturées en « bitartrate de K » (en fait, en ions bitartrates) calculée, en fonction du pH, à partir de leur teneur en acide tartrique total (formule de DUTOIT et DUBOUX). Il est conduit à des observations détaillées que l'on pourra consulter dans son Mémoire.

Il aboutit, en particulier, aux mêmes conclusions que les auteurs précédents relativement à l'influence des acides malique et lactique sur la solubilité du tartrate acide de K avec la nuance suivante cependant : l'addition d'acide malique à une solution saturée en tartrate acide de K rend possible la solubilisation d'une quantité nouvelle de ce corps sans que croisse la quantité de bitartrate (il faut lire d'ions bitartrates) réellement en solution. Ces effets, apparemment inconciliables, s'expliquent, comme nous le verrons, par l'abaissement du pH que provoque l'addition d'acide.

De plus, d'après le même auteur, la fermentation malo-lactique stabiliserait les vins vis-à-vis des chutes de tartre, celui-ci devenant plus soluble ; il se base sur la constatation que, dans les solutions synthétiques de tartrate acide de K, contenant les uns de l'acide malique, les autres, à égale concentration moléculaire, de l'acide lactique, la teneur en « bitartrate de K », traduisons « ions bitartrates », calculée par lui, est dans le cas de l'acide malique, supérieure à celle du milieu correspondant contenant de l'acide lactique ; nous verrons que cela résulte simplement des différences de pH.

La substitution équimoléculaire de l'acide lactique à l'acide malique doit théoriquement, si le pH est inférieur à 3,5 en solution aqueuse, 3,6 ... 3,8 en solution alcoolique, conduire à une insolubilisation un peu plus grande de tartrate acide de K, du fait de l'élévation de pH devant en résulter.

La considération, dans les tableaux III*a* et IV*a* de TOMASSET (tableau I de notre Mémoire), des teneurs respectives en potasse des solutions étudiées, de concentration presque équimoléculaire en acides malique et lactique, ne montre pas une teneur en tartrate acide de K plus élevée de la solution de ce premier acide.

TABLEAU I

	Tableau 3 a (Tomasset)			Tableau 4 a (Tomasset)		
Alcool	Ac. mal. mmol/l	K méq/l	pH	Ac. lactique mmol/l	K	pH
0	15	30	3,05	14,3	29,7	3,09
8	15	20	3,03	14,3	19,7	3,09
10	15	18	2,99	14,3	17,7	3,06
14	15	16	3,01	14,3	15,7	3,09
18	15	13	3,05	14,3	12,7	3,11

3) *Influence des conditions météorologiques au cours de la maturation du raisin, sur la teneur des vins en acide tartrique et en potasse.*

J. VENTRE et E. BOUFFARD (1922 (8), 1933 (9)) d'une part, FONZES-DIACON (1922 (10) (17)) d'autre part, constatent qu'en période pluvieuse, les raisins s'enrichissent particulièrement en potasse ; les vins sont, de ce fait, le siège de cristallisations intenses de tartrate acide de K ; leur indice de tartre (Fonzes-Diacon) 1925 (17) est inférieur à l'unité ; ce caractère a été proposé par son auteur, avec une teneur en potasse supérieure à 4 g/l, exprimée en tartrate de K, et deux autres caractères, pour contribuer à distinguer des vins mouillés, les vins simplement anormaux (cf. JAULMES (5)).

FERRÉ (1925 (16)) montre aussi que les moûts et les vins des bonnes années contiennent plus d'acide tartrique que les autres ; son « cœfficient de maturation », rapport de l'acidité tartrique à l'acidité organique totale, égal à 50 p. 100 les années moyennes, atteint alors 70 à 90 p. 100.

Pour mettre en évidence le mouillage éventuel, JAULMES et SLIZEWICZ (1938-1943) (5) (18) (18'), utilisent une relation spéciale aux vins potassiques (anciens vins anormaux qui, certaines années, sont les plus nombreux) qu'ils caractérisent par leur indice de tartre inférieur à 0,8.

J. VENTRE (9) montre aussi qu'en présence d'excès de potasse, l'effet du tartricage sur l'augmentation de la teneur des vins en acide tartrique peut être négligeable ou même négatif, alors que l'acidité fixe du vin traité n'est parfois que très peu accrue.

BRÉMOND (1937 (11) signale « une relation étroite entre le pH des vins et l'indice de FONZES-DIACON, sauf dans les vins blancs riches en sulfate ». Les vins algériens de plaine et de côteaux ont d'ordinaire un indice de tartre voisin de 1 (0,7 à 1,1 pour une centaine d'échantillons). « Par contre, dans les vins de montagne, ce rapport est presque toujours nettement inférieur à 1 (0,4 à 0,58 pour une trentaine d'échantillons). Il ne faudrait pas en conclure, en appliquant la règle Fonzes-Diacon, que ces vins sont anormaux ; ils constituent au contraire des crus de plus en plus réputés, tels que les Miliana, les Médéa et les Mascara.

L'acidité totale des moûts de raisin des régions de montagne est généralement faible parce que la maturation s'y poursuit jusqu'à l'extrême limite ; leur teneur en sucres est toujours très élevée, mais cela aux dépens des acides tartrique et malique. Le potassium s'accumule au fur et à mesure de la maturation, si bien qu'au moment de la cueillette, les moûts ont fréquemment une acidité totale sulfurique de 1,5 g à 2,5g par litre, ce qui est manifestement insuffisant. »

Il étudie les proportions salifiées, dans les vins, des acides organiques et en particulier de l'acide tartrique. Il trouve que, pour ce dernier, elles sont moins variables que pour les autres à cause de la faible solubilité du tartrate acide de K.

FLANZY (1947) (19) déduit de l'analyse de vins de diverses origines qu'il n'y a pas parallélisme régulier entre l'humidité de l'été et la teneur en potassium des vins ; il cite comme particulièrement caractéristiques à cet égard, les vins de l'Aude de la récolte 1943 présentant un gros excès de potasse (indice de tartre : 0,40 à 0,88 pour 12 vins cités) alors que l'année avait été extrêmement chaude et sèche. Il souligne que les variations de l'indice de tartre dépendent aussi du numérateur, de l'influence du climat sur le métabolisme de l'acide tartrique, ce que FONZES-DIACON n'avait d'ailleurs pas passé sous silence.

D'après PEYNAUD (1957) (20), une période de sécheresse s'accompagne d'une diminution de l'acide tartrique du grain.

L'on comprend ainsi le faible indice de tartre des vins de l'Aude de 1943 et des vins de montagne d'Algérie.

Ces remarques montrent que l'expert ne doit utiliser l'indice de tartre qu'avec beaucoup de discernement ; il n'en reste pas moins qu'il reste jusqu'à ce jour un test complémentaire précieux.

L'on ne saurait trop louer JAULMES et SLIZEWICZ de l'étude si fouillée qu'ils ont faite sur le diagnostic du mouillage des vins sur la base de très nombreuses analyses et d'une rigoureuse critique constructive, cherchant à éviter à l'expert, au maximum, le risque de conduire d'honnêtes gens devant les tribunaux.

γ) *Les vins restent-ils normalement sursaturés?*

Brémond (1937) (11), en Algérie, signale que « tous les vins naturels examinés apparaissent saturés en bitartrate de potassium ; en effet pour une richesse en alcool donnée, la teneur en acide tartrique salifié, exprimée en bitartrate de potassium, est à peu près constante, et correspond sensiblement à celle d'une solution de même degré alcoolique, saturée en ce constituant.

Une exception est à faire pour les vins tournés dans lesquels les doses d'acide tartrique sont toujours très faibles ».

Il ajoute : « D'après nos constatations relatives à la saturation des vins d'Algérie en bitartrate de potassium, il semble qu'il soit possible d'utiliser la mesure du pH pour s'assurer si un vin est naturel.

En effet, l'addition d'eau ou d'un acide minéral fort à un vin, provoque une diminution sensible de la teneur en acide tartrique salifié, ce que l'on reconnaît rapidement par le dosage de l'acide tartrique total et par détermination de la concentration des ions H : dans ce cas, le vin n'est plus saturé en bitartrate de potassium, et on peut présumer une fraude ».

Pour Genevois (14), les vins pourraient, suivant la composition de la matière première, « les années où prédominent acide libre et acide malique « ne pas être saturés. Enfin, Genevois et Ribereau-Gayon (1947) (21) et Jaulmes (1951) (5), signalent combien longtemps le vin peut donner encore naissance à des cristaux de tartre, rester donc sursaturé de nombreux mois.

Nous avons tout récemment (1), alors que notre travail était presque achevé, pris connaissance du très intéressant mémoire de Berg et Keefer (1958) (22) ; d'après ces auteurs, les vins de dessert maintenus à — 3°9C nécessitent 20 et 42 jours et les vins secs 16 et 116 jours pour atteindre les niveaux d'équilibre de solutions hydro-alcooliques de tartrate acide de K respectivement à 20 et 15°C.

Les vins naturels étudiés par Gentilini (37) étaient par contre, d'après lui, en général non saturés en tartrate acide de K à la température ordinaire.

On conçoit de toutes façons qu'ils puissent le devenir sous l'action de certaines pratiques.

Cet auteur a étudié, à cet égard les effets de la réfrigération, du mouillage, de l'addition de divers acides, de métabisulfate de K et de Carbonate de Ca qui, les uns et les autres, augmentent plus ou moins l'insaturation des mêmes vins.

Si, dans les conditions ordinaires de température, un vin d'acidité suspecte est capable de dissoudre plus de 500 mg, de tartrate acide

(1) Notre bibliographie, à la fin de ce travail, pourra être utilement complétée par celle donnée par ces auteurs.

de K par litre (essai effectué sur vin décoloré), il a été dit-il, certainement acidifié par un acide minéral.

De notre coté (1953) (23), appliquant à l'acide tartrique et à ses sels, la relation $A/AH^- = pH - pK$ déduite de la loi d'action de masse et celle plus précise de DUTOIT et DUBOUX, nous avons mis en évidence deux pH remarquables et appliqué ces considérations (1957) (24) à la mise au point d'une technique simple et précise de dosage de l'acide tartrique que nous utiliserons au cours de ce travail.

Rejoignant DEIBNER (36) (1) pour l'intérêt qu'il porte à l'« Œnométrie », l'un de nous a, d'autre part (1954) (25) établi, sur la base de cette même loi, une relation permettant théoriquement de calculer la quantité de tartrate acide de K susceptible de cristalliser dans des vins maintenus suffisamment longtemps à une température donnée.

Les vins auxquels nous avions appliqué ce calcul se sont montrés nettement sursaturés en ce sel acide, après l'hiver, aux températures moyennes de celui-ci.

Le but que nous nous sommes proposé, la prévision de l'acidité des vins, nécessite de vérifier si cette relation est utilisable et avec quelle approximation.

L'influence solubilisante des acides autres que l'acide tartrique, stabilisante des colloïdes protecteurs, autant de facteurs susceptibles de gêner.

Il convient d'étudier leur effet perturbateur à cet égard, mais tout d'abord de préciser ce que l'on entend par « solubilité du tartrate acide de K ».

B. — Définition de la solubilité du tartrate acide de K. —

La solubilité d'un corps dans un solvant est le poids de ce corps capable de se dissoudre dans une quantité bien précisée de ce liquide, à une température donnée (première définition) ; on l'exprime généralement en grammes pour cent millilitres ou par litre ; il peut être préférable de l'exprimer en équivalents ou en fractions d'équivalents, ou en molécules ou fractions de mol.

Dans le cas de solvants contenant en solution de l'acide tartrique ou du potassium ou l'un et l'autre en proportion différente de celle correspondant stoechiométriquement à la molécule de tartrate acide de potassium, la solubilité de celui-ci est représentée à l'équilibre par la plus faible des teneurs de la solution, t en acide tartrique total, p en potasse, exprimées, dans ce cas, en mmol/l.

Etant donnée la dissociation dont la molécule d'un électrolyte est le siège, en solution, il peut paraître à priori plus juste d'exprimer la solubilité du tartrate acide de K, comme l'a fait TOMASSET, en considérant

la concentration de la solution en « ions bitartrates », mais elle n'est pas un reflet fidèle de ce que nous souhaitons mesurer.

C'est la teneur du milieu en molécules non dissociées de tartrate acide de K qui est la solubilité réelle de ce sel acide (deuxième définition) ; mais nous ne perdrons pas de vue la solubilité définie plus haut (première définition) qui nous intéresse pratiquement.

Pour voir l'ensemble de la question, il faut d'autre part, considérer la « solubilité de l'acide tartrique en présence de potassium » et « celle de ce métal en présence d'acide tartrique ».

Suivant que $t-p$ est positif ou négatif, c'est l'une ou l'autre de ces solubilités qui se confond avec celle (première définition) du tartrate acide de potassium.

En définitive, il est nécessaire de distinguer, dans les conditions données de température et de degré alcoolique :

1° La solubilité globale du tartrate acide de K (première définition).

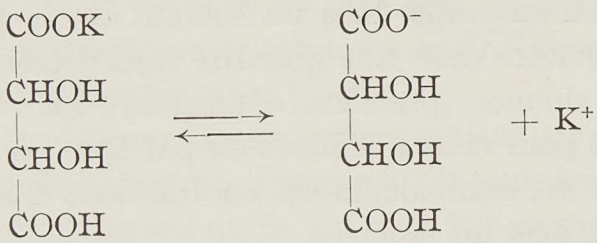
2° La teneur de la solution en mol. non dissociées de tartrate acide de potassium (deuxième définition).

3° la solubilité de l'acide tartrique en présence de potassium ou celle du potassium en présence d'acide tartrique.

Dans les vins, l'ensemble des équilibres en jeu est plus complexe encore.

Il comporte, outre ceux qui existent entre l'acide tartrique, la potasse et les ions provenant de leur dissociation, les équilibres entre les ions tartrates, et chacun des cations du milieu, entre l'ion K^+ et chacun des anions du milieu.

Celui qui nous intéresse plus particulièrement ici, étant donné que la solubilité du corps le moins soluble détermine la composition de la solution saturée, est le suivant (1) :



La solubilité S totale de l'acide tartrique en présence de potassium dans des conditions déterminées, comprend :

1° La concentration So en molécules non dissociées de tartrate acide de K ; cette concentration est constante à température donnée, dans un solvant bien précisé : eau ou solution alcoolique.

2° Les concentrations S1 et S2 en ions tartrates acides et tartrates.

(1) En supposant négligeable, comme nous l'avons signalé, l'influence du calcium.

3° La concentration S3 en acide tartrique non dissocié.

4° La concentration S4 en tartrate neutre de K non dissocié.

Ce qui limite cette solubilité de l'acide tartrique, c'est le produit de solubilité du tartrate acide de K :

$$[TH^-] \times [K^+] = K_1 \times S_0 = \text{constante } s,$$

fonction des degrés alcooliques et centigrades.

Etant donné quela concentration en ions tartrates acides est, elle-même, liée à celle en molécules d'acide tartrique, et cela de façons différentes selon le pH qui résulte de l'équilibre entre l'ensemble des molécules et ions en présence, lesquels sont dans les vins, fort variés, la solubilité du tartrate acide de K, dans une solution de degré alcoolique et de température bien précisés, c'est-à-dire le poids en g/l ou le nombre de mmol/l par exemple, susceptibles de se dissoudre ou de s'insolubiliser à partir d'une solution saturée, est fonction non seulement des concentrations en acide tartrique total et en potasse mais aussi du pH de la solution saturée qui, dans les vins, dépend d'ailleurs surtout de ces deux facteurs.

Elle est encore, pour un pH déterminé, fonction de la concentration du milieu en autres cations et anions, mais la connaissance des trois éléments que nous venons de citer détermine l'effet de ceux-ci du point de vue qui nous intéresse, mise à part l'influence de la force ionique du milieu.

Dans la mesure où l'acide tartrique pourrait former un complexe tel qu'un ferritartrate, il y aurait augmentation de la solubilité de cet acide ; nous ne nous occuperons pas de cet effet qui ne peut être que négligeable dans les vins naturels du point de vue qui nous intéresse ici.

Par contre, l'effet de certains corps étrangers comme l'acide métatartrique, lorsqu'il en est ajouté au vin, n'est pas négligeable ; c'est la raison, d'ailleurs de son emploi.

Etant donné le nombre des facteurs en jeu, il faut, pour prévoir la quantité de tartrate acide de K susceptible de cristalliser par refroidissement d'un vin à une température connue, serrer le problème de plus près.

L'essai préalable parfois conseillé qui consiste à mettre quelques jours un échantillon de vin à basse température peut être intéressant, mais il ne donne qu'une idée vague de ce que nous souhaitons déterminer.

II. — PRÉVISION DE LA QUANTITÉ DE TARTRATE ACIDE DE K, QUI CRISTALLISERA.

Etant donné un moût ou un vin dont nous avons dosé :

le degré alcoolique,

l'acidité fixe,

l'acide tartrique total t, exprimé en mmol/l,
la potasse totale p, exprimée en mmol/l,
le pH,
quelle quantité de tartrate acide de K, le liquide laissera-t-il cristalliser si on abaisse sa température à n°C?

Nous surpposerons, pour simplifier, que le pH de la solution ne varie pas au cours de la cristallisation ; nous savons (23) que c'est d'autant moins vrai qu'il s'éloigne plus de 3,5 ou 3,6-3,8 suivant le degré alcoolique. Cette variation de pH est cependant très faible dans les liquides considérés ici.

Il s'agit de calculer la teneur du liquide en acide tartrique total, une fois l'équilibre réalisé, en supposant qu'il ne se maintient pas sursaturé, et qu'il n'est soumis à aucune fermentation pendant la cristallisation.

A. — Calcul de la quantité t_n d'acide tartrique une fois l'équilibre réalisé à n°C.

Supposons que nous connaissons la composition du vin en fin de fementation alcoolique et recherchons sa teneur en acide tartrique, une fois réalisé l'équilibre précédemment défini.

Si s est le produit de solubilité du tartrate acide de K dans ces conditions, nous devons avoir alors :

$$[TH^-] \times [K^+] = s \ (1)$$

En admettant que les sels de potassium sont complètement dissociés, ce qui est approximatif, nous avons : concentration en potasse totale exprimée en mmol/l à n°C :

$$p_n = [K] \neq [K^+].$$

Soit, d'autre part :

$$\frac{[\text{ions tart. ac.}]}{[\text{ac. tart. total}]} = \frac{[TH^-]}{t_n} = c.$$

Il en résulte qu'approximativement :

(1)
$$ct_n \cdot p_n = s$$
$$t_n \times p_n = \frac{s}{c}.$$

Au cours de la cristallisation, la différence entre les concentrations en acide tartrique total et potasse totale reste théoriquement constante, donc :

(2)
$$t_n - p_n = t - p$$

(1) Les facteurs de cette relation sont normalement exprimés en nombres d'ions/l. Nous les exprimerons, pour simplifier, en m ions/l,. c'est-à-dire que notre s représente le produit de solubilité multiplié par 10^6.

d'où l'équation

$$t_n^2 - (t - p)t_n - \frac{s}{c} = 0 \qquad (3)$$

dont l'une des racines donne t_n

$$t_n = \frac{t - p + \sqrt{(t-p)^2 + 4\frac{s}{c}}}{2} \qquad (4)$$

t et p = acide tartrique et potasse totaux en mmol/l dans la solution sursaturée.

t_n et p_n = acide tartrique et potasse totaux en mmol/l dans la solution saturée à n°C.

s = le produit de solubilité du tartrate ac. de K à n°C : $s = [TH^-] \times [K^+]$ dans la solution saturée à cette température.

s est fonction du degré alcoolique

$$c = \frac{[TH^-]}{[\text{ac. tartique total}]}$$

Etant donnée une solution d'acide tartrique en présence de potassium, un vin par exemple à f°C, la relation (4) permet de calculer la teneur en acide tartrique total (non compris l'acide tartrique complexé) de cette solution ou de ce vin à la température n°C < f° C, une fois l'équilibre réalisé, donc la quantité $(t\text{-}t_n)$ de tartrate acide de K qui doit cristalliser lorsqu'on amène la température du liquide de f° à n°C.

Il faut, pour cela,

1° Avoir déterminé par l'analyse t et p.

2° Avoir déterminé une fois pour toutes ou savoir calculer s et c ou $\frac{s}{c}$, connaissant le degré alcoolique et le pH du liquide.

L'utilisation de cette formule nécessite quelques approximations (7) (JAULMES).

1° Celles qui ont conduit à la relation $\log \frac{[TH^-]}{[TH_2]} = p\text{H} - p\text{K}$ ou à celle plus précise de DUTOIT et DUBOUX (5) (26), utiles pour déterminer la valeur de c, c'est-à-dire, pour la première relation : solution étendue d'un acide très faible (ce qui n'est pas parfaitement le cas pour la première fonction acide de l'acide tartrique), tel que l'on puisse supposer son degré d'ionisation négligeable, alors que les sels sont, eux, supposés intégralement ionisés ; DUTOIT et DUBOUX admettent que le degré moyen d'ionisation des sels est 0,9 et sont obligés de tenir compte de ce que la concentration des ions A^- provenant de l'acide AH n'est pas

connue ; on sait simplement qu'elle est inférieure à la concentration en ions H^+, de l'ordre de $\frac{[H^+]}{2}$.

2° Nous supposons qu'au cours de la précipitation du tartrate acide de K, le pH ne varie pas (ce qui est exact vers 3,5 ; 3,8) ou de façon négligeable (ce qui est d'autant moins vrai que le pH du liquide est plus loin de ces valeurs, mais acceptable entre pH 3 et 4).

3° Nous n'avons pas tenu compte de la précipitation possible d'acide tartrique sous forme de tartrate de calcium, ni de son maintien en solution, en petite proportion, sous forme de complexes solubles.

La relative complexité des calculs et l'indétermination qui résulterait d'une connaissance insuffisamment précise de la constante de dissociation de la deuxième fonction acide de l'acide tartrique et des variations des constantes de dissociation avec la température, nous ont amené à déterminer expérimentalement, en fonction du pH et du degré alcoolique, les valeurs de

$$t_n \times p_n = \frac{s}{c}$$

La valeur de t_n se déduira alors de la relation (4) avec plus de sécurité et de facilité, cette dernière condition étant particulièrement importante pour les besoins de la pratique.

Il conviendra, bien entendu, d'étudier les facteurs éventuels de perturbation intervenant dans les solutions de composition complexe telles que le vin si tant est que leur influence s'avère supérieure aux erreurs expérimentales commises lors de la détermination des valeurs de $\frac{s}{c}$.

B. — Détermination de $\frac{s}{c} = t_n\ p_n$ aux températures n = + 2°C et + 8°C.

Dans ce but ont été préparées des solutions aqueuses et hydro-alcooliques de teneurs croissantes en acide tartrique d'une part, en potasse d'autre part.

Elles ont été agitées à + 2°C, en présence d'un excès de cristaux de tartrate acide de K. Leur acidité a été suivie en fonction du temps jusqu'à ce qu'elle se soit montrée constante.

L'augmentation maximum d'acidité a donné la solubilité du sel acide.

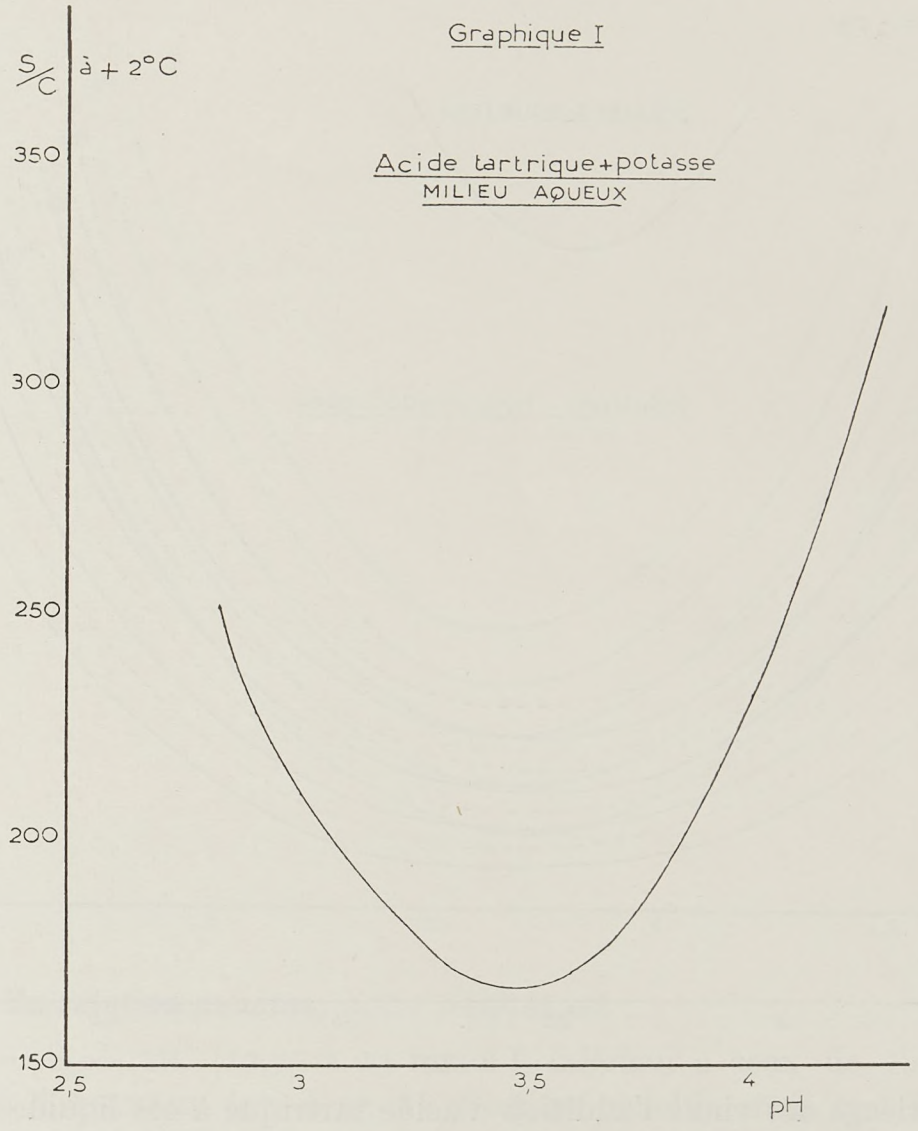
Ont alors été tracées, en fonction du pH des solutions ainsi obtenues :

— d'une part les graphiques I, II et III : courbes des points représentatifs de :

$$\frac{s}{c} = t_2 \times p_2 \text{ et } \frac{s}{c} = t_8 \times p_8$$

produits à + 2°C et + 8°C de leurs teneurs en acide tartrique total et en potasse, exprimées en mmol/l.

Remarquons que nous avons affaire approximativement à des



paraboles dont l'axe de symétrie est parallèle à celui des y et d'autant plus loin de celui-ci, sans que la différence soit grande, que la solution en question est plus riche en alcool. Cela traduit l'influence de l'alcool sur la constante de dissociation des acides.

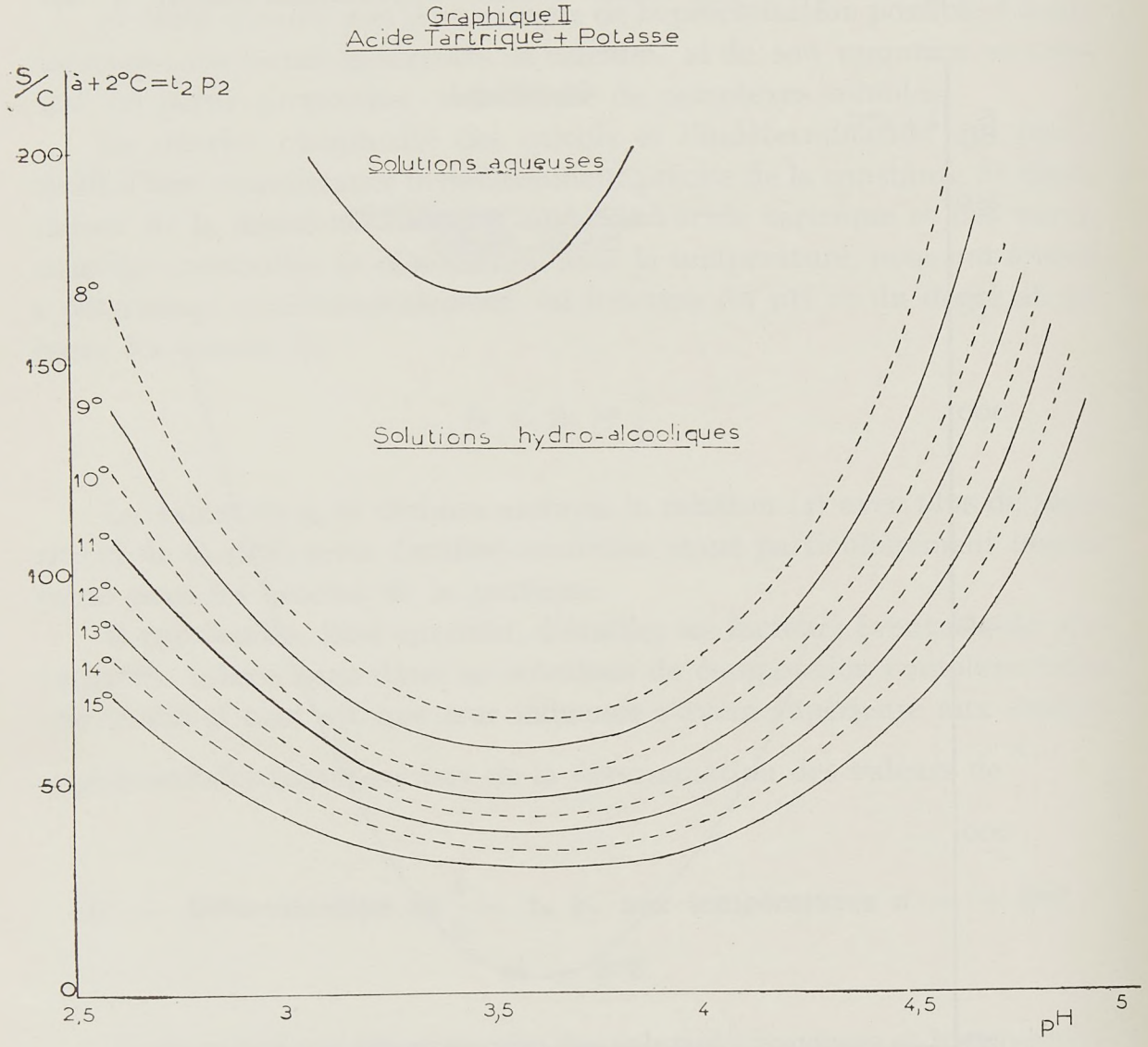
Le sommet de la parabole est en même temps, bien entendu, d'autant plus près de l'axe des x que la solution est plus riche en alcool, le tartrate acide de K devenant alors moins soluble.

— d'autre part, sur un autre graphique : (gr. V) :

les concentrations en acide tartrique total (courbe TH_2) et en potasse totale (courbe K) en mmol/l ;

les solubilités du tartrate acide de K en mmol/l (c'est-à-dire les quantités de ce sel acide qui se sont dissoutes) : courbe TKH confondue avec les portions inférieures des précédentes.

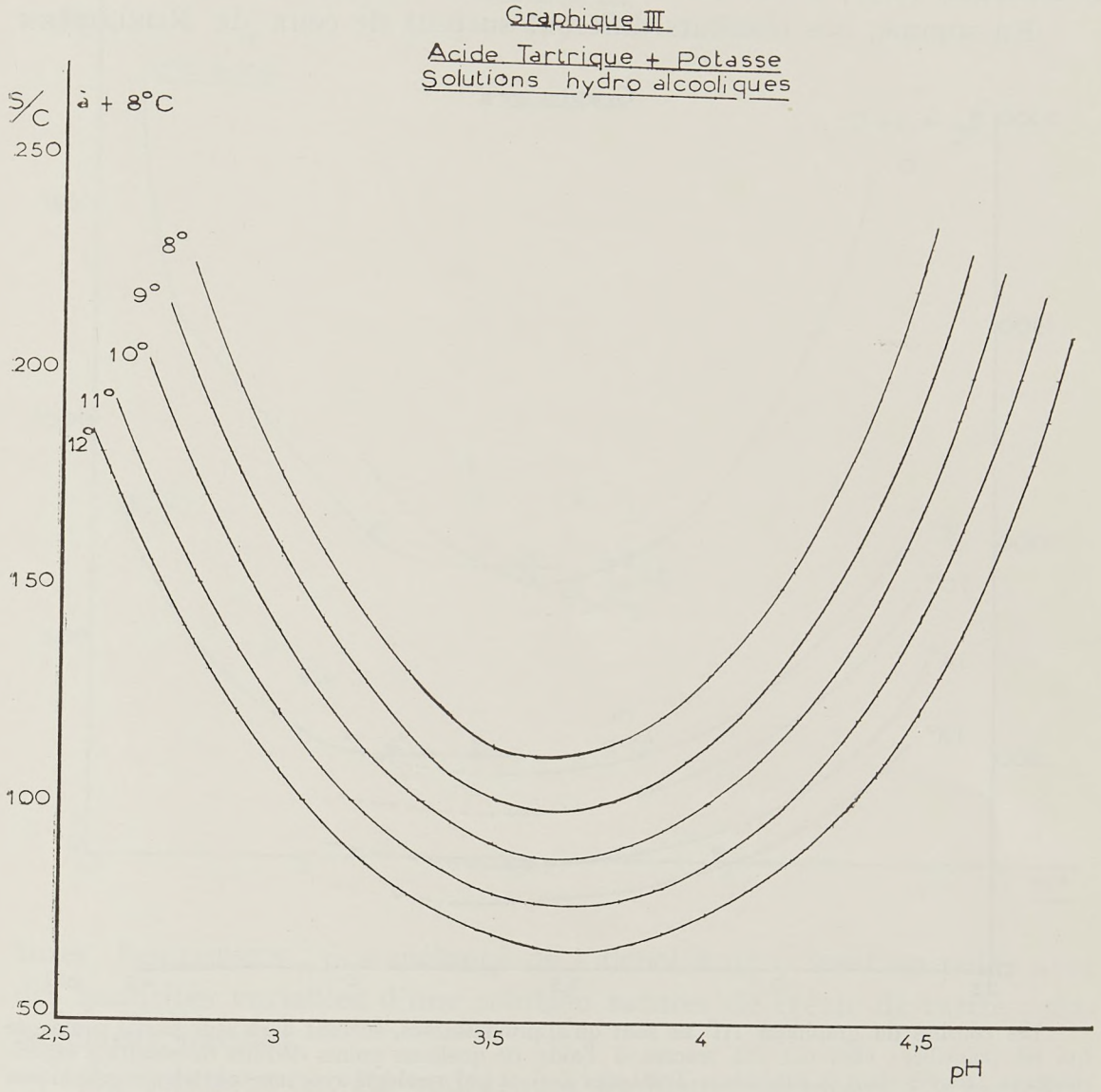
Le graphique V traduit en particulier, à certains égards, les effets



du tartricage des vins : l'addition d'acide tartrique à ces liquides, outre qu'il en augmente l'acidité fixe, en abaisse le pH, en diminue la teneur en potassium, n'en augmente pas, comme on pourrait le croire au premier abord toujours la teneur en acide tartrique comme le montre la courbe TH_2 qui présente un minimum vers pH 3,7. On comprend que VENTRE (9') ait pu dire que le tartricage avait parfois pour effet de diminuer la teneur en acide tartrique du vin ; ce n'était pas forcément à mettre sur le compte d'une rupture de sursaturation provoquée par l'agitation du liquide.

C. — **Comparaison de nos résultats à ceux d'autres auteurs.**

Les solubilités du tartrate acide de potassium en solutions aqueuse et hydro-alcoolique à diverses températures, diffèrent quelque peu avec les auteurs.



En solution aqueuse, notre résultat est :

— à + 2°C (12,75 à 13 mmol/l) inférieur à ceux de ROELOFSEN (3) et d'ALLUARD (27) à 0° (16,48 et 17 mmol/l), mais égal à celui de CHANCEL (1) à 0°.

— à 20° C, supérieur (30 mmol/l) à celui de ROELOFSEN (26 mmol/l) mais très voisin, quoique légèrement plus élevé que celui de CHANCEL (29 mmol/l). Mais les résultats de CHANCEL sont un peu plus faibles que ceux d'ALLUARD.

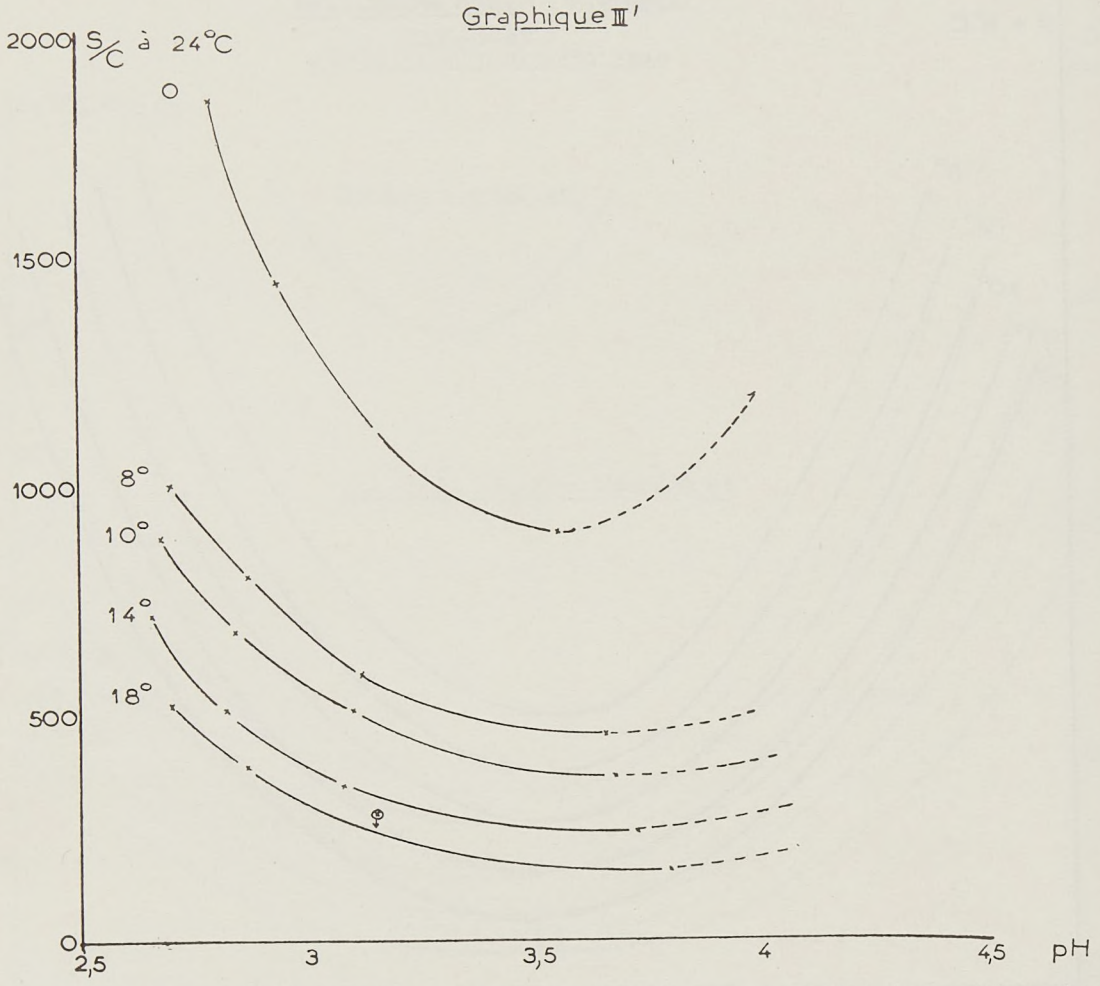
A 10° d'alcool, à — 2°C, LABORDE (4') trouve un résultat 7,4 mmol/l très légèrement supérieur au nôtre (7,2) à + 2°C qui est inférieur à ce qu'obtient (8 mmol/l) TOMASSET (12) à — 2°C.

A 10° 2 d'alcool, à 18°C, notre résultat 14, 87 ± 0,13 est légèrement inférieur à celui de PAUL et BOHNEN (4') (14) : 15,6 pour 10° 1 d'alcool.

A 12° d'alcool, et + 2°C, notre résultat 6,6 mmol/l, est légèrement inférieur à celui de LABORDE (7,2) au même degré et inférieur à celui de ROELOFSEN (9,57) à 12°25 d'alcool à la même température.

En somme, nos résultats diffèrent surtout de ceux de ROELOFSEN

Graphique III'



Les courbes du graphique III' ne sont qu'approximatives, surtout dans leur partie prolongée qui est pointillée ; elles ont été tracées à l'aide de quelques points déduits de résultats expérimentaux trouvés dans la littérature TOMASSET (12) et par analogie avec nos courbes des graphiques I, II et III.

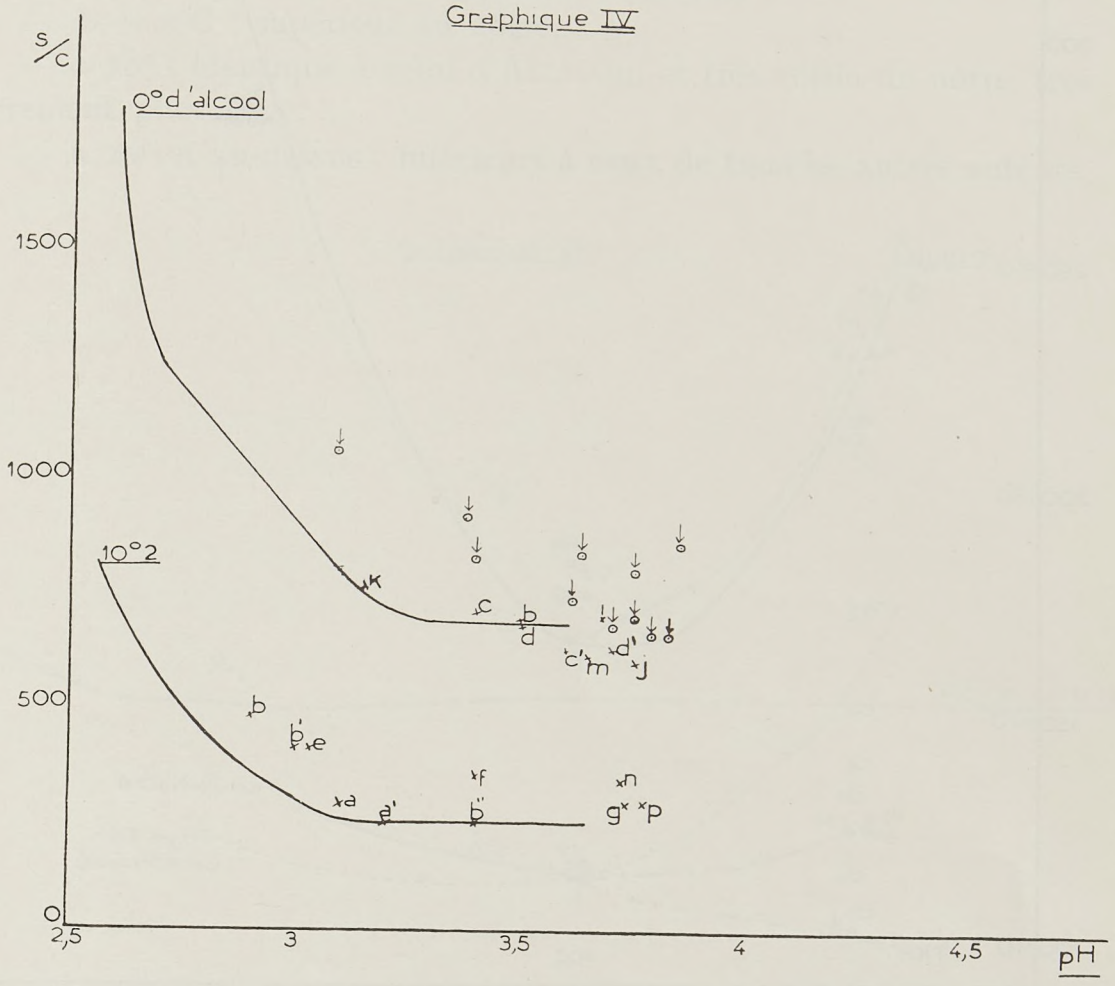
On consultera avec plus de sécurité le graphique VII établi ultérieurement.

en plus ou en moins suivant les cas, et ils sont inférieurs à ceux de TOMASSET et de LABORDE, ce que montrent, outre les nombres précédemment signalés, les produits *tp* à — 2°C établis à partir des résultats de TOMASSET, points qui apparaissent légèrement au-dessus de nos courbes $\frac{s}{c}$ à + 2°C, alors qu'ils devraient être logiquement plus bas si la solubilité du tartrate acide de K continue à décroître au-dessous de + 2°C lorsque baisse la température.

Les différences correspondent à des erreurs absolues pouvant attein-

dre 4 mmol/l si l'on ne tient pas compte de l'écart de températures $\Delta t = 4°C$; elles sont donc parfois légèrement supérieures à 4 mmol/l.

Pour déterminer la solubilité du tartrate acide de K dans l'eau et des solutions hydroalcooliques de divers degrés à différentes tempéra-



tures, ROELOFSEN (3) a mélangé de l'alcool à 93 p. cent en poids avec des quantités variables d'une solution saturée de crème de tartre préalablement purifiée.

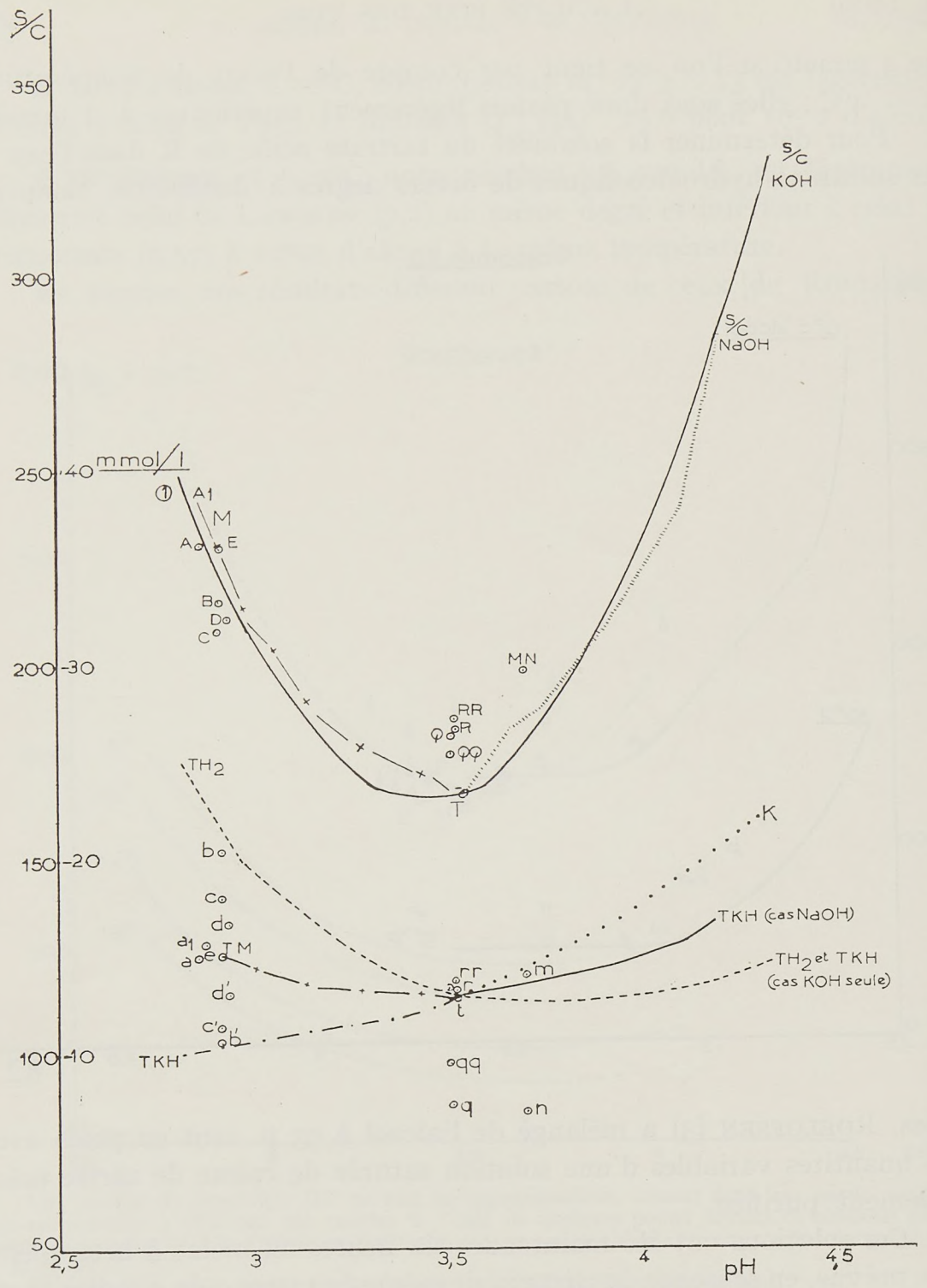
Ces solutions ont été maintenues six heures au moins à la température prévue, en présence de cristaux de crème de tartre, afin d'éviter toute sursaturation et agitées fréquemment.

L'auteur signale qu'aux températures élevées (il ne précise pas au-dessus desquelles), il n'y avait pas assez de tartrate acide de K, sauf aux doses élevées d'alcool.

Nous en déduisons que, dans tous les autres cas, les solutions finales qu'il a analysées, en les admettant saturées, ont été préparées à partir de solutions sursaturées.

La durée de cristallisation adoptée par ROELOFSEN étant très faible (6 heures) par comparaison avec celle que nous avons constatée utile (2 à 4 jours à + 2°C pour obtenir une solution pratiquement stable),

Graphique V



Courbe 1 = $\frac{s}{c}$ pour des solutions saturées d'acide tartrique + potasse à 2° C.

Courbe M = $\frac{s}{c}$ pour des solutions saturées d'acide tartrique + potasse + acide malique à + 2°C (tableau VI.)

Courbe NaOH = $\frac{s}{c}$ pour des solutions de tartrate acide de K + soude + acide malique (Tableau VIII).

Courbe T H^2 = acide tartrique total en mmol/l dans la solution saturée en tartrate acide de K préparée à partir de solvants contenant de l'acide tartrique ou de la potasse.

Courbe T K H = tartrate acide de K en mmol/l qui s'est dissous (cas où la solution ne contient pas de soude) (du côté droit, elle se confond avec la courbe TH_2).

Courbe T M = acide tartique total en mmol/l dans la solution saturée de T K H préparée à partir de solvants contenanr de l'acide malique. (tableau VI).

Courbe T' K H = t. ac. K. qui s'est dissous (cas où la solution avait été primitivement additionnée de soude) (tableau VIII.)

Courbe K = potasse en mmol)l.

on conçoit que ses résultats soient, aux basses températures, entachés d'erreur par excès ; par contre, aux températures élevées, les solutions ont pu ne pas être saturées.

D'où les différences constées entre les résultats.

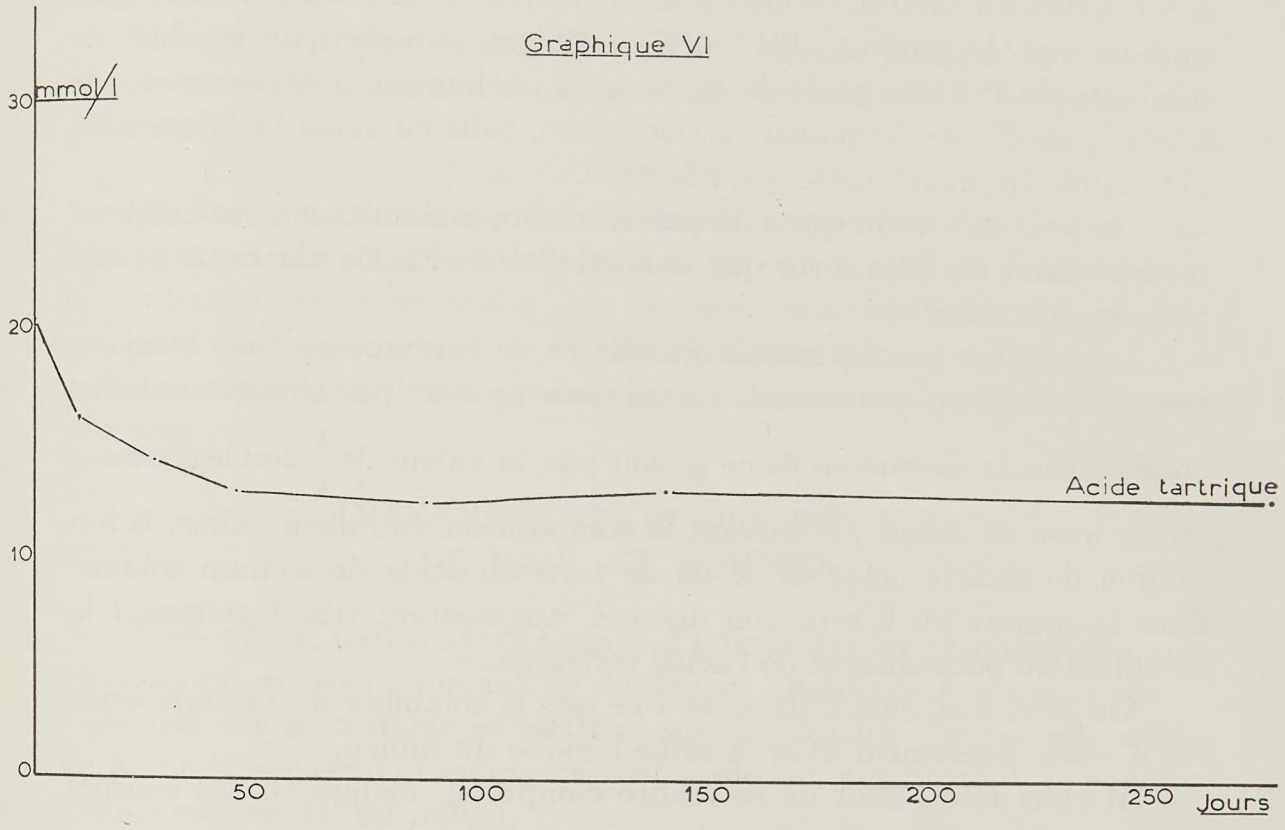
Les siens apparaissent en solutions aqueuses,

— à + 2°C : supérieur au nôtre.

— à 18° : identique à celui d'ALLUARD et très voisin du nôtre, très légèrement plus élevé.

— à 20° et au-dessus : inférieurs à ceux de tous les autres auteurs.

Graphique VI



Notre mode opératoire fut par contre, sauf peut-être dans le détail de l'application, identique à celui de TOMASSET ; nos résultats devraient mieux concorder avec les leurs.

Avec les valeurs indiquées par BERG et KEEFER (22), dans la mesure où elles sont comparables avec les nôtres, ayant été obtenues dans les mêmes conditions de degrés, des différences, tantôt dans un sens, tantôt dans l'autre, apparaissent aussi, mais elles sont inférieures à la demi mmol/l.

D. — Influence sur $\frac{s}{c}$ des ions, autres que les ions tartrates et K, ne provoquant pas la formation de sels insolubles avec ces derniers.

Si, à une solution d'ions tartrates et potassium, on ajoute un acide ou une base, même de nature différente, on modifie, par le fait qu'on

change le pH, la valeur de $\frac{s}{c}$ et la solubilité de l'acide tartrique et du potassium.

Supposons que, dans le milieu, on remplace une partie de la potasse par de la soude en proportion telle que le pH ne varie pas, le produit $[TH^-] \times [K^+]$ devant rester constant, la solubilité de l'acide tartrique va croître.

Supposons que le même changement soit effectué entre l'acide tartrique et l'acide malique ou un autre acide, si le liquide était primitivement saturé en tartrate acide de K, il pourra en dissoudre d'autre jusqu'à ce que le produit $[TH^-] \times [K^+]$ atteigne la valeur du produit de solubilité du tartrate acide de K, mais ce phénomène aboutissant à une teneur plus élevée du milieu en potassium, celle en acide tartrique sera plus faible qu'avant cette modification.

On peut concevoir que l'on puisse effectuer simultanément ces deux modifications de telle sorte que la solubilité de l'acide tartrique ne soit pas changée.

La relation précédemment établie et ce raisonnement ne tiennent pas compte de ce que les sels en solution ne sont pas entièrement dissociés. Dans la mesure où ils ne le sont pas, la valeur de $\frac{s}{c}$ doit légèrement varier avec un même pH suivant la composition du milieu ; ainsi, la formation de malate acide de K ou de tartrate acide de sodium soluble, dans la mesure où il sera non dissocié, augmentera très légèrement la solubilité du potassium et de l'acide tartrique.

On peut d'ailleurs s'attendre à ce que la solubilité du tartrate acide de K varie légèrement avec la force ionique du milieu.

Il était intéressant de se rendre compte si, malgré ce, les courbes que nous avons obtenues restent pratiquement valables.

On pouvait, d'autre part, se demander si certains acides, tels les acides malique et lactique, n'auraient pas une influence spécifique sur la solubilité de l'acide tartrique.

Cela pour les raisons suivantes :

1° Tout d'abord, les travaux antérieurs, comme nous l'avons vu accordent aux acides malique et lactique un pouvoir dissolvant vis-à-vis du tartrate acide de K.

2° En second lieu, lors de notre travail (24) sur le dosage de l'acide tartrique dans les moûts et les vins, nous avons été amenés à constater que l'acide malique retardait la cristallisation du tartrate acide de K et qu'il était d'autre part en partie entraîné par les cristaux ; ce dernier fait avait été antérieurement signalé par SEMICHON, FLANZY, et Mlle LAMAZOU-BETBEDER (30).

Nous avons vu (24) que tout se passait comme s'il était entraîné sous forme de malate acide de K.

De nos observations, nous avions déduit qu'il devait y avoir « interaction moléculaire entre ces sels acides et entre leurs ions » et formation d'une combinaison labile dissociable en ions dont le produit de solubilité influerait sur la solubilité apparente de l'acide tartrique (liaisons esters et peut-être aussi hydrogène).

Un accroissement de la solubilité du tartrate acide de potassium était alors explicable sans que l'on ait affaire à une sursaturation du liquide en ce sel.

Nous avions ajouté cependant qu'un « simple phénomène physique d'orientation et d'attraction entre molécules suffirait à expliquer nos constatations. »

3° Enfin, nous avons plus récemment appris que DAMANSKI, ARSENIJEVIC et Mme Lucie ARSENIJEVIC (32) ont séparé de raisins verts, ne contenant pas plus de 5 p. 100 de sucre, une combinaison équimoléculaire d'acide *d*-tartrique et d'acide *l*-malique qu'ils ont obtenue cristallisée ; cependant, ils n'en précisent pas la concentration dans la matière première.

1. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE PAUL ET BOHNEN.

Nous avons, tout d'abord, essayé d'interpréter les résultats de PAUL et BOHNEN en nous efforçant de distinguer l'influence éventuelle spécifique des acides malique et lactique sur la solubilité du tartrate acide de K, de l'effet général qu'exerce tout acide en augmentant la concentration en ions H^+ du milieu.

Dans ce but, nous avons calculé les produits $[TH^-] \times [K^+]$ de chaque solution.

Ces résultats sont portés sur les tableaux II, III, IV et V, déduits des tableaux des pages 312 et 314, 315 et 326 du mémoire de GENEVOIS (14).

a) *Constatations relatives aux produits* $[TH^-]$ $[K^+]$.

Les produits de solubilité exprimés en prenant pour facteurs les concentrations en mmol/l, sont pour le tartrate acide de K :

435 en solution aqueuse à 18°C
155 en solution de 10°2 d'alcool à 18°C

d'après les échantillons n° 7 du tableau II.

Ils apparaissent sans très grandes variations, surtout en solution aqueuse, dans le cas des autres solutions de ce même tableau. Par contre,

Tableau II

Solutions pures d'acide tartique + potasse 18 °C.

N Solution aqueuse à 18°C	Acidité totale en méq/l	Acide tartrique en mmol/l	K en milli-ions /l	pH	$(TH^-) \times (K^+)$ relation simple	$(TH^-) \times (K^+)$ Dutoit et Dubout	tp
7	26	26	26	3,60	419	435	676
6	51	36	21	3,13	390	429	758
5	76	48,5	21	2,87	407	447	1019
4	101	61	21	2,68	384	422	1280
3	128	74,5	21	2,60	374	448	1560
2 non saturés	134	73	12	2,43			
1 non saturés	133	66,5	0	2,12			
Solution à 80 g d'alcool éthylique par litre (10^02 à 18°)							
7	15,5	15,5	15,5	3,64	149	155	240
6	41	26	10	3,06	125	140	260
5	66	38,5	11	2,80	152	171	424
4	91	51	11	2,70	168	201	560
3	119	65,5	12	2,57	172	206	785
2 non saturés	132	71	10	2,54	142	184	710
1 non saturés	133	66,5	0	2,19			

Tableau III

Solution aqueuses à 18 °C.

Acide malique mmol.	Acide lactique mmol.	Acide tartrique mmol.	Acidité totale méq/l	K total méq/l	pH	$(K^+) \times$ relation simple	(TH^-) Dutoit Dubout	tp
46,5	0	33,5	133	27 non sat.	2,97			
		32	123	32	3,09	519	570	1 024
		27,5	112	34	3,37	560	616	932
		20,05	93	41	3,70	492	521	840
		17,5	62	63	3,86	618	661	1 100
0,0	23,5	33,5	86	27 non sat.	3,38			
		29	75	29	3,63	521	542	840
		25	65	32	3,75	460	483	800
		21	49	41	3,85	480	513	860
23,5	11,5	33,5	105	27 non sat.	2,98			
		27,5	95	30	3,40	505	535	825
		23	83	32	3,61	457	475	736
		17	64	39	3,79	382	401	662
33,5	16,5	17	94	40 non sat.	3,70			
		15,5	86	45	3,75	418	439	698
		12	69	55	3,83	374	392	660

Tableau IV

Solution hydroalcooliques 10°2 à 18 °C.

	Acide malique mmol.	Acide lactique mmol.	Acide tartrique mmol.	Acidité totale méq/l	K total méq/l	pH	$(TH^-) \times (K^+)$ relation simple	$(TH^-) \times (K^+)$ Dutoit et Dubout	tp
	45,65	0,0	26,5	133	13 non saturé				
			25,5	125	19				
e			20	113	20	3,04	196	215	400
f			15,5	102	22	3,40	207	219	340
g			9,5	29	29	3,73	165	173	275
	0	23,3	26,5	86	13 non saturé	3,01			
h			27,5	76	26	3,49	443	465	713
i			24	65	29	3,68	486	515	696
j			19	54	31	3,75	347	364	588
	23,3	11,65	26,5	110	13 non saturé	2,98			
k			29	102	26	3,15	387	425	752
l			23,5	88	29	3,49	415	435	681
m			19,5	78	31	3,64	368	382	605
	33,35	16,65	13,5	100	27 non saturé	3,61			
n			10,5	90	31	3,72	195	204	325
p			8	81	35	3,77	165	170	280

Tableau V

Solutions saturées en tartrate acide de potassium.
Même teneur en acide tartique ; Degré alcoolique : 10°2.

	Acide malique mmol/l	Acide lactique mmol/l	Acide tartrique mmol/l	Acidité totale	K total	pH	$(TH^-) \times (K^+)$ relation simple	$(TH^-) \times (K^+)$ Dutoit et Dubout	tp
a	0	0	25	39	11	3,1	140	154	275
b	46,5	0	25	124	19	2,9	199	218	475
c	23,5	23	25	92	28	3,4	426	451	700
d	0	47	25	70	27	3,5	417	437	675
a'	0	0	20	28	12	3,2	132	145	240
b'	46,5	0	20	113	20	3,0	188	206	400
c'	23,5	23	20	79	31	3,6	381	400	620
d'	0	47	20	56	31	3,7	371	389	620

en présence d'acide malique ou d'acide lactique (tableaux suivants), ils sont bien souvent — mais pas toujours — nettement plus élevés, atteignant 661 (sol. aqueuse) et 515 (sol. hydroalcoolique), pouvant faire penser, en effet, à une influence solubilisante spécifique de ces acides. Cependant, les variations constatées ne sont pas parallèles dans les deux séries ; elles sont dans chacune d'elles désordonnées.

b) *Constatations relatives aux valeurs de* $\frac{s}{c}$.

Si nous reportons sur le graphique IV, pour chaque solution,

en ordonnées, les valeurs de $\frac{s}{c} = tp$,

en abscisses les pH,

nous pouvons dessiner les courbes de variation de $\frac{s}{c}$ en fonction du pH dans le cas de solutions a queuse et hydro-alcoolique (10°2) d'acide tartrique et de potasse (tableau II).

Nous plaçons, d'autre part, les points représentatifs des solutions contenant en outre de l'acide malique ou de l'acide lactique ou l'un et l'autre de ces acides (tableaux III, IV et V).

La majorité des points, dans le cas des solutions hydro-alcooliques, est au-dessus de la courbe témoin ; certains d'entre eux en sont fort éloignés ; ce sont, pour ce qui a trait au tableau V, les points représentatifs de solutions contenant de l'acide lactique, c, d, c', d', alors que a b a' b', points représentatifs de solutions ne contenant pas d'acide lactique, mais de l'acide malique, en sont fort près.

Pour le tableau IV, les points relatifs à l'acide lactique sont plus éparpillés mais la plupart d'entre eux feraient apparaître, en présence de cet acide, les solutions à 10 degrés d'alcool à peu près aussi riches en tartrate acide de K que les solutions aqueuses sans acide lactique, à la même température.

Dans le cas de la solution aqueuse, les points considérés, désignés avec des flèches sur le graphique, sont presque tous au-dessus de la courbe témoin, mais de façon désordonnée, non interprétable ; acides malique et lactique paraissent néanmoins avoir généralement un effet favorable à la solubilité du tartrate acide de K.

Notons par contre, que les solubilités du tartrate acide de K trouvées par PAUL et BOHNEN, en l'absence d'autre acide, coïncident assez bien avec nos résultats ; ils sont très légèrement supérieurs (Immol/l de plus environ).

« Expérimentalement, PAUL a procédé ainsi pour établir le tableau II, p. 312 (4) soit notre tableau II p. 270 avec les résultats duquel nous avons construit les courbes du graphique IV p. 265.

« Il a pris une solution à 10 g par litre soit 66,5 millimolécules d'acide tartrique (1) ; il a ajouté à cette solution des quantités croissantes de tartrate neutre de K, 6,66 mmol/l, puis 2 fois, 4 fois, 6 fois et 8 fois cette quantité.

Le tartrate neutre a réagi sur l'acide tartrique pour donner du bitartrate qui a partiellement précipité, à partir de la ligne 3 (2). Le précipité obtenu (à partir de 2 jours d'agitation de la solution) a été recueilli et pesé ; la solution a été titrée acidimétriquement puis... ».

L'emploi d'acide lactique imparfaitement pur, contenant des acides lactyllactiques ou des lactides partiellement saponifiés ultérieurement, n'aurait-il pas fait croire à une plus grande solubilité du tartrate acide de K?

Le mode opératoire de PAUL ne permet pas, d'ailleurs, d'assurer que la solution avait, lors de l'analyse, acquis son état d'équilibre. Si BOHNEN, élève de PAUL, a utilisé le même mode opératoire, on peut l'affirmer d'autant moins que les acides malique et lactique retardent la cristallisation du tartrate acide de potassium, ce qui suffit pour expliquer l'apparent accroissement de solubilité de ce sel acide.

2. — ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE

Elle a eu pour but de mettre en évidence les modifications éventuelles de $\frac{S}{C}$ avec celles de la composition du milieu en prenant comme témoins les valeurs représentées par la courbe précédemment établie (graphique I) dans le cas des solutions aqueuses, et reportée en (I) sur le graphique V avec les courbes TH_2 et TKH des teneurs en acide tartrique total des solutions saturées et des quantités de tartrate acide de K qui se sont dissoutes.

1° INFLUENCE DE L'ACIDE MALIQUE.

Elle est mise en évidence par la courbe M (graphique V) déduite du tableau VI et divers points isolés A, C, D etc... (même graphique, tableau VII).

a) *Solutions saturées à + 2°C de tartrate acide de K obtenues à partir de solutions aqueuses de concentrations croisantes en acide malique.*

Cela revenait à remplacer dans les milieux précédemment obtenus (courbe témoin 1 pour $\frac{S}{C}$ et courbe TH_2) l'acide tartrique initial (c'est-

(1) Solution n° 1.
(2) Ligne 3 du tableau II, en remontant; c'est à dire à partir des échantillons du tableau II dont les numéros sont supérieurs à 2.

à-dire en solution avant dissolution des cristaux) par de l'acide malique sans modifier le pH du liquide final.

Les points correspondants donnent la courbe M (graphique V) déduite du tableau VI très légèrement au-dessus de la courbe 1 ; la dis-

TABLEAU VI

Influence de l'acide malique — Solubilité du tartrate acide de potassium dans une solution aqueuse d'acide malique

	1	2	3	4	5	6	7 = T
Acide malique	23,27	17,87	14,25	5,37	1,62	0,8	0
Tartrate acide dissous (Courbe TM)	15,1	14,5	14,3	13,45	13,07	12,96	12,95
pH final	2,92	2,99	3,05	3,25	3,47	3,5	3,54
s/c (Courbe M).....	230	211	206	181	171	168	167,5

tance intercourbes est inférieure à la grandeur représentative de l'erreur expérimentale constatée, nous ne pouvons donc affirmer, quoique ce soit vraisemblable, qu'elles sont distinctes. La concentration de la solution en acide malique est cependant loin d'être négligeable puisqu'elle varie de 0,8 à 23 mmol/l.

L'ordre de grandeur des erreurs est donné par la position des points suivants :

E et A devraient être confondus ; B du tableau VII devrait être sur la courbe 1 ; remarquons que l'erreur commise sur B est de l'ordre de 6 p. 100, ce qui correspond à une erreur absolue de l'ordre de la mmol/l. (1,5 mmol/l.)

Si même l'acide malique a une influence spécifique sur la solubilité du tartrate acide de K, elle ne peut donc être que très faible, à moins qu'un phénomène de compensation ne se produise entre du malate acide de K (insolubilisé sous forme par exemple d'une combinaison avec du tartrate acide) et d'autre part du tartrate acide de K dissous de ce fait en supplément. L'analyse chromatographique sur papier n'a pas permis de déceler d'acide malique dans les cristaux restant non dissous, dans nos essais, la saturation une fois réalisée.

De toutes façons, la prévision de l'acidité fixe finale du vin ne peut être entachée d'erreur de ce fait.

b) *Solutions saturées à + 2°C de tartrate acide de K, sans ou avec acide malique, préparées de telle sorte qu'elles aient le même pH* (tableau VII).

Comparons à pH 2, 9, à la solution B sans acide malique, des solutions de teneurs croissantes en un tel acide.

Tableau VII

Influence de l'acide malique, combinée à celle de la soude et de la potasse.

	pH 2,9				pH 3,52					pH 3,7	
	Pas d'ac. mal.	Avec ac. malique			Pas d'ac. mal.	Avec acide malique				Avec acide malique	
	B	C	D	A	T	Q	R	QQ	RR	N	M
Composition initiale du solvant :											
Ac. tartrique en mmol/l	9,81	6,59	3,25	0	0	0	0	0	0	0	0
Ac. malique en mmol/l	0	5,66	15,71	28,56	0	27,6	27,7	14,27	14,27	27,56	27,56
Potasse en méq/l	0	0	0	0	0	17,7	0	8,92	0	21,87	0
Soude en méq/l	0	0	0	0	0	0	18,15	0	9,04	0	22
Composition finale de la solution saturée :											
Tart. ac. de K dissous en mmol/l	10,58	11,51	13,02	15,2	12,88	7,3	13,53	9,56	13,63	6,85	14,04
Ac. tart. final en mmol/l	20,39	18,1	16,27	15,2	12,88	7,3	13,53	9,56	13,63	6,85	14,04
Potasse finale en méq/l	10,58	11,51	13,02	15,2	12,88	25	13,53	18,48	13,63	28,72	14,04
pH final	2,92	2,92	2,94	2,88	3,54	3,51	3,52	3,51	3,52	3,7	
s/c	216	209	212	231	166	183	183	177	186	197	197
Excédent dissous du tart. ac. de K sur B		1,07	2,44	4,62							

Nous constatons que la valeur de $\frac{S}{C}$ varie peu, celle de A, plus élevée que B pouvant s'expliquer, compte tenu des erreurs expérimentales possibles, par la différence de pH qui correspond à une zone pour laquelle la courbe $\frac{S}{C}$ en fonction du pH est très inclinée. Sur le graphique, la droite BA n'est pas en effet loin d'être parallèle à la courbe témoin.

Comparons, d'autre part, les diverses solutions T, Q, R, QQ, RR à pH 3,52 (voisin de celui de la solution aqueuse saturée du tartrate acide de K) ; la valeur de $\frac{S}{C}$ est ici nettement, quoique assez faiblement plus élevée en présence d'acide malique ; pour ce qui a trait à la solubilité de l'acide tartrique, cela ne correspond qu'à une augmentation de 0,75 mmol/l, soit de 5 à 6 p. 100.

On voit aussi (comparer *c*, *d* avec *b*, *c'* et *d'* avec *b'*; Q avec R, QQ avec RR du tableau VII et du graphique 5 et les points *q* et *qq* avec *r* et *rr* du graphique 5) que :

α) Si l'on remplace à pH constant 2,9 par exemple, de l'acide tartrique par de l'acide malique, la solubilité de l'acide tartrique en présence de K décroît quoique la quantité de tartrate acide de K qui se dissout croisse (lettres primes pour ce dernier lorsque son point représentatif diffère de celui représentant l'acide tartrique total) [1].

Voir le tableau VII et sur le graphique V, les points *c*, *d* et *a* représentant les teneurs finales des solutions C, D et A en acide tartrique total ; ils sont tous au-dessous de *b* correspondant à la solution B sans acide malique et de la courbe TH_2 (teneur en ac. tartrique en l'absence d'acide malique) alors que *c'*, *d'* et *a'*, relatifs au tartrate acide de K qui s'est dissous, sont au-dessus de la courbe TKH représentant le tartrate acide de K qui se dissout en l'absence d'autres acides et cations.

Cela met bien en évidence l'intérêt qu'il y avait à bien préciser ce qu'on voulait entendre par solubilité du tartrate acide de K.

La quantité de tartrate acide de K qui se dissout, augmentant lorsqu'on remplace de l'acide tartrique par de l'acide malique, on peut bien dire que l'acide malique accroît la solubilité de ce sel acide, mais ce n'est pas une propriété qui lui est propre quoiqu'elle se montre même lorsqu'on maintient le pH constant. La théorie le prévoit de la même façon pour les autres acides et l'expérimentation le prouve (voir le pragraphe 3).

β) Si l'on remplace de la potasse par de la soude à pH constant, la solubilité de l'acide tartrique augmente ; ce qui est bien normal. Ces solutions ont le même $\frac{S}{C}$. Mêmes remarques à pH 3,7 (N et M). La courbe T'KH (côté droit du graphique v) de l'acide tartrique qui s'est dissous dans le cas de la soude est au-dessus de la courbe TKH relative au cas où il n'y a que de la potasse alors que les courbes $\frac{S}{C}$ correspondantes, sont presque confondues.

(1) Cette opération accroît au contraire, à un pH donné, la solubilité de K en présence d'acide tartrique. lors du dosage de K par précipitation de tartrate acide de potassium (Méthode Pasteur Reboul), il faut donc ajouter d'auant plus d'acide tartrique que le vin est plus riche en acide malique.

c) *Influence de l'acide malique* (compléments).

Nous avons voulu néanmoins, nous rendre compte de façon plus précise de l'influence de l'acide malique.

Dans ce but, nous avons préparé des solutions saturées de tartrate acide de K dans des solutions aqueuses d'acide malique de deux façons différentes

1° Par cristallisation progressive à température donnée, de solutions sursaturées à chaud de tartrate acide de K.

2° Par solubilisation progressive ;

et de telle façon qu'elles aient le même pH (emploi de NaOH).

La solubilité était donnée par le point de rencontre des courbes de variation des teneurs des liquides en tartrate acide de K.

La même opération a été réalisée avec des liquides hydroalcooliques.

TABLEAU VIII

Solubilité du tartrate acide de K dans des solutions aqueuses de soude.

	1	2	3	4	5	6	7
Soude en méq/l	0	0,55	1,1	2,2	4,5	6,4	8,2
Tart. ac. de K dissous en mmol/l (Courbe TKH (NaOH).....	12,5	12,74	13,05	13,30	14,18	15,25	16,49
pH final	3,55	3,6	3,65	3,74	3,92	4,10	4,19
s/c (Courbe NAOH).....	156,2	162,3	170,3	176,9	201	232,6	271,9

TABLEAU IX

Influence de l'acide malique sur la solubilité du tartrate acide de K.

Solvants	t. ac. K dissous mmol/l	t. ac. K dissous en plus
à + 2°C		
a : Eau (pH 3,52)	13,75	
b : Eau + 25 mmol. d'ac. malique/l + NaOH.....	15,13	1,38
c : Eau + 50 mmol. d'ac. malique/l + NaOH.....	15,57	1,82
à 18°C		
a : Eau.....	25,25	
b : Eau + 25 mmol/l d'ac. malique + NaOH..	26,88	1,63
c : Eau + 50 mmol/l d'ac. malique + NaOH.....	28,82	3,57
à + 24°C		
a : Eau.....	34,75	
b : Eau + 25 mmol/l d'ac. malique + NaOH.....	36,88	2,13
c : Eau + 50 mmol/l d'ac. malique + NaOH.....	38,82	4,07

a) L'influence, à cet égard, de la levure alcoolique, en supposant qu'au cours de la fermentation, aucune insolubilisation de tartrate acide de K ne se produit.

b) Ayant, alors, obtenu une solution alcoolique sursaturée en ce sel acide, prévoir l'acidité fixe de cette solution, une fois l'équilibre réalisé à la température finale envisagée.

c) L'influence des fermentations bactériennes n'est pas à perdre de vue étant donnés leur possibilité, leur intérêt ou le danger qu'elles présentent, mais l'on n'est jamais certain, soit de les éviter, soit de les réaliser pures ni complètes.

d) En vinification en rouge, l'influence des matières solides ne sera pas à perdre de vue.

e) Nous envisagerons enfin, le cas particulier de la concentration.

1. — Prévision en l'absence d'action bactérienne et de constituants solides de la vendange.

A. — Influence de la levure.

Ce microorganisme est susceptible d'exercer une action de plusieurs façons, sur l'acidité fixe :

α) Au cours de sa multiplication, la levure assimile divers ions. Etant donnée la petite quantité de levures qui se forme, environ 2 à 3 g. par litre, et le fait qu'anions et cations assimilés se compensent à peu près, on peut considérer cet effet comme négligeable sur l'acidité fixe, sauf pour ce qui a trait à l'ammoniac, dont l'épuisement du moût presque total, se traduit par la libération de fonctions acides jusque vers 10 méq/l.

L'assimilation d'acide phosphorique par la levure diminue l'acidité en quantité correspondant à 2 méq. par mmol. assimilée ; cet effet est réduit par l'assimilation de K par la levure, qui augmente de plus très légèrement (1 méq. environ) la différence « t — p », d'où une moindre précipitation d'acide tartrique sous forme de tartrate acide de K qu'elle ne se produirait sans cela, en vinification en blanc ou en rosé tout au moins.

La correction correspondante, très faible, devient à fortiori négligeable, — quoique celle relative à l'acide phosphorique apparaisse alors devoir être plus élevée dans le cas de la vinification en rouge — en face des modifications résultant de la solubilisation de sels divers, de potasse plus particulièrement au cours de la macération.

En ce qui concerne la désamination d'acides aminés, nous admettrons, sauf pour ce qui concerne la formation d'acide succinique, qu'elle

se traduit seulement par l'apparition, dans le milieu, d'alcools secondaires.

β) Le métabolisme fermentatif de la levure conduit à l'enrichissement du milieu aux dépens des sucres presque exclusivement, et, pour une très légère part, d'acides aminés, en acides succinique, lactique et citrique, dans les proportions respectives suivantes dans les conditions normales de la vinification, suivant PEYNAUD (33) :

ACIDE SUCCINIQUE

de 0,65 g, à 0,25 g ; moy. : 0,45 g pour 100 g de sucres fermentés, soit 0,72 à 1,9 méq. par degré alcoolique, moyenne : 1,3.

ACIDE LACTIQUE

5 à 10 méq/l : généralement, environ : 6.

ACIDE CITRIQUE

1 méq/l environ.

Par contre, d'après ce même auteur, une partie de l'acide malique serait fermentée : 10 à 30 p. 100 de sa teneur initiale ; à moins qu'il ne soit comburé.

Il ne paraît ni utile ni d'ailleurs possible avec avantage, dans l'état actuel de nos connaissances, de tenir compte des acides formés en très faible proportion, caractérisés par CARLES, Mᵉˡˡᵉ LAMAZOU-BETBEDER et Mᵐᵉ Renée PECH (35).

γ) Après la fermentation, même si les levures restent quelque temps au contact du vin, elles n'ont plus d'effet en anaérobiose sur l'acidité fixe. (Par soutirage, elles sont d'ailleurs séparées assez tôt du vin, pour la plupart, lorsqu'on souhaite éviter les développements bactériens.) Il n'en est plus de même si on les laisse se développer en voile de fleur à la surface du liquide ou indirectement lorsqu'on laisse les vins sur leur lie pour favoriser la fermentation malolactique.

B. — Influence de l'insolubilisation de tartrate acide de K.

Nous avons vu [(25) et chap. II de ce travail] que la quantité de tartrate acide de K qui doit théoriquement s'insolubiliser, fonction du degré alcoolique et de la température finale, peut se calculer, une fois connu le produit de solubilité correspondant de ce sel acide.

La complexité du calcul et l'indétermination qui résulte d'une connaissance insuffisamment précise des pK de l'acide tartrique aux températures considérées, nous ont conduit à établir expérimentalement les courbes de variations de $\frac{s}{c} = t_n\, p_n$ en fonction du pH, aux températures

n = 2°C et + 8°C, et pour des solutions hydroalcooliques diverses, saturées à ces mêmes températures en tartrate acide de K.

s = produit de solubilité $\times$ 10^6

c = coefficient, fonction du pH, par lequel il faut multiplier l'acide tartrique exprimé en mmol/l pour avoir la concentration du tartrate acide en milli-ions par litre.

t_n et p_n = l'acide tartrique et la potasse exprimés en mmol/l de solution saturée à n°C = par ex. 2°C.

$\frac{s}{c}$ étant donc donné par ces courbes, pH et degré alcoolique futurs une fois précisés, il suffit d'appliquer notre formule (4 p. 259).

Un point important, mais difficile à prévoir, c'est le pH futur.

Il dépend de l'ensemble des phénomènes que nous venons d'indiquer ainsi que du sulfitage, du pouvoir tampon du milieu, de la quantité de tartrate acide de K qui cristallise, et de la zone de pH à laquelle ce phénomène se produit.

En vinification en rouge, au cours de la macération, interviennent les matières solides qui enrichissent le liquide en divers ions et en modifient le pH.

C. — Réalisation : Analyses et Calculs.

En définitive, la prévision de l'acidité fixe d'un vin nécessite l'analyse préalable du moût aux points de vue suivants :

— sucres,
— degré alcoolique en puissance
  16,5 g de sucre par litre donnent un degré d'alcool en vinification en blanc (moût sulfité) ;
  18 g/l environ en vinification en rouge.
— pH
— acidité totale
— acide tartrique total, exprimé en mmol/l
— potasse, exprimée en mmol/l
— acide malique, — id —
— ammoniaque, exprimée en mmol/l.

$\frac{s}{c}$ est donné, en fonction du degré et du pH par le graphique de courbes tracées à partir de données expérimentales avec des solutions aqueuses et hydroalcooliques d'acide tartrique et de potasse. (Graphiques I, II, III, III').

a) *Calcul de l'influence de la levure sur l'acidité fixe.*

	méq /l
NH_3 n mmol/l.....	+ n
acide succinique méq/l : 1,3 × degré futur =	.....
acide lactique	+ 6
acide citrique	+ 1
acide malique m mmol/l, à retrancher....	— 0,15 × 2m
Augmentation d'acidité fixe : Total.....	Δ Al méq/l

b) *Calcul de la baisse d'acidité fixe résultant de l'insolubilisation de tartrate acide de K.*

Appliquer la relation :

$$t_n = \frac{t - p + \sqrt{(t-p)^2 + 4\frac{s}{c}}}{2}$$

t_n = acide tartrique en mmol/l dans le vin à l'équilibre à + n°C = 2°C par ex.

t et p = acide tartrique et potasse du moût (ou du vin) sursaturé, exprimés en mmol/l.

Variation d'acidité correspondante : $t\text{-}t_n = \Delta A_l$ méq/l.

c) *L'acidité prévue du vin à n°C = + 2°C par ex.*

est : $A + \Delta A_l - \Delta A_t$.

Lorsqu'on prend comme point de départ un vin sursaturé au lieu d'un moût, il n'y a pas à considérer l'influence de la levure ; l'acidité fixe finale prévue du vin à $n°$ C est alors : $A' - \Delta A_t$ (A ou A' étant les acidités fixes initiales du moût ou du vin).

2. — Prévision de l'acidité des vins dans le cas où intervient la fermentation malolactique.

Cela nécessite :

1° De connaître la teneur en acide malique des moûts.

2° D'admettre que l'acide malique sera décomposé entièrement en acide lactique et CO_2 ou en proportion connue :
à une mmol. d'acide malique fermenté par litre correspond théoriquement une baisse d'acidité fixe d'un méq/l.

3° De prévoir la variation de pH qui sera due à la transformation

de l'acide malique en acide lactique. Cette variation, fonction de la quantité d'acide malique qui est attaqué, doit aussi dépendre du pouvoir tampon du milieu. Dans la mesure où cette élévation de pH pourrait être prévue, il y aurait lieu, lors même du calcul de la chute de tartre, de tenir compte du pH final qui en résulterait.

Cette augmentation de pH est en fait soumise à trop de facteurs ; mais elle est généralement faible, de l'ordre d'un ou deux dixièmes d'unité pH. On peut tenir compte de cette modification approximative.

Peut-être conviendrait-il de tenir compte aussi des effets complémentaires du métabolisme des ferments, en particulier pour ce qui concerne les acides aminés (PEYNAUD, ARCHINARD) ? Mais rien ne permet de prévoir si l'acide malique aura entièrement fermenté ; l'erreur risque, de ce fait ou par suite de réactions différentes de catabolisme de l'acide malique, de rendre négligeables ces corrections.

3. — Cas d'une désacidification partielle, préalable ou non à la fermentation malolactique.

On sait que la fermentation malolactique démarre d'autant plus difficilement que le pH est plus bas ; il peut être nécessaire ou favorable d'élever le pH par une légère désacidification préalable. Le danger réside alors dans le fait que deux facteurs de désacidification ajoutent leurs effets dont la somme peut être exagérée. D'où l'importance d'évaluer leurs effets probables.

L'effet du carbonate de Ca, lorsqu'on utilise ce sel, est relativement important sur le pH (de l'ordre de 0,1 unité pH pour 50 g. de CO_3 Ca par hl) alors qu'il est relativement faible sur l'acidité fixe, plus faible que ne l'indique la réaction de neutralisation, par le fait qu'il ne peut ensuite précipiter du liquide traité qu'une quantité moindre de tartrate acide de K.

Si l'on estime pouvoir « évaluer » la variation de pH due à la désacidification partielle du moût ou du vin (1), notre méthode de calcul permet d'acquérir une idée de l'acidité fixe finale du vin, dans les différents cas :

sans désacidification chimique,

avec désacidification chimique partielle (plus ou moins forte) et pour chacun de ces cas, avec ou sans fermentation malolactique.

Elle pourrait donc permettre de prévoir, dans une mesure peut-être intéressante (c'est ce que montrera l'expérience) la méthode la plus compatible avec la sécurité du résultat et avec la qualité.

(1) Le traitement « du vin » n'est pas autorisé en France et celui du « moût » seulement dans certains cas.

Nous ne discuterons pas ici des avantages respectifs de la désacidification partielle du moût ou du vin.

D'après MICHOD (43) la composition finale du vin est la même dans les deux cas ; d'autre part, quoique le pH en résultant temporairement, immédiatement après le traitement chimique, soit un peu plus élevé dans le second cas, le liquide ayant alors déjà perdu une partie de son tartrate acide de potassium, il n'en résulterait pas une rétrogradation suffisamment ni régulièrement plus précoce pour que la date du traitement soit intéressante à considérer.

On peut se demander cependant, à notre sens, étant donnés les facteurs en jeu, si la date optimum de désacidification ne se situerait pas entre celles qui ont servi de point de repère lors de cette expérimentation, lorsque la fermentation tumultueuse n'est pas achevée alors que l'insolubilisation de tartrate acide de K sous l'action de l'alcool est cependant assez avancée. L'on ne peut en juger étant donné que l'auteur n'indique pas la densité du liquide lors de l'opération.

4. — Cas de vinification en rouge.

Voir en fin du chapitre IV.

5. — Choix de la matière première destinée à la concentration des mouts et des vins.

Le degré de concentration ayant été fixé, on peut facilement calculer la composition théorique du concentré, en supposant nulles les insolubilisations et les modifications chimiques, puis, à partir de ces résultats, calculer la teneur en acide tartrique total à l'équilibre à n°C.

La seule donnée qu'il est nécessaire d'évaluer est la variation du pH : l'expérimentation devra être réalisée pour voir s'il est possible de le faire avec une approximation suffisante.

Nous avons fait de tels calculs à partir des résultats d'analyse des témoins *a* et *b* d'une expérimentation de BRÉMOND (1954) (11'), en supposant une diminution de pH de 0,05 unité pour un degré de concentration de 1,2/1 environ (tableau XI).

Les colonnes *b'* et *c'* donnent la composition théorique des vins concentrés, avant toute insolubilisation ou volatilisation de leurs constituants et les teneurs en acide tartrique prévues à l'équilibre à 24°C et à 8°C.

On remarquera qu'elles coïncident avec les quantités d'acide tartrique prévues à ces mêmes températures à partir des résultats analytiques des vins concentrés *b* et *d*. Le vin *b* apparaît légèrement sursaturé à 24°C et le vin *c* exactement saturé à cette température.

TABLEAU XI

	a Vin témoin	*b'* prévu théo.	*b* Vin concentré	*c* Vin témoin	*c'* prévu théo.	*d* Vin concentré
Degré alcoolique	10°4	12°08	12°08	10°3	12°7	12°7
Acidité totale en méq/l .	72,3	83,86	79,5	74,5	91,63	86,5
volatile en méq/l .	8,7	10,09	9,6	5,75	7,07	7,75
fixe en méq/l....	63,6	73,87	70,0	7,65	83,02	77,5
pH	3,26	3,21	3,26	3,26	3,21	3,23
Acide tartrique total en mmol/l.....	19,94	23,13	18,72	17,23	21,19	15,42
Potasse totale en mmol/l	29,25	33,93	28,72	22,87	27,13	21,59
Indice de tartre	0,68	0,68	0,65	0,75	0,75	0,71
tp.....	583,2	784,8	537,6	394	574,9	332,9
s/c à 24°C	410	385	360	410	360	330
s/c à 8°C	99	83	81	101	77	75
t_{24}	19,1	14,95	13,9	17,4	15,38	15,04
t_8	8,86	5,69	5,29	7,62	5,64	6,11
Acidité fixe prévue à 24°C.....		65,7	65,2		77,2	77,2
Acidité fixe prévue à 8°C.....		56,4	56,6		67,5	68,2

Une telle prévision réalisée pour 24 ou 20°C (voir le chapitre V) devrait permettre, sinon de calculer avec certitude à cause des sursaturations, l'acidité finale, du moins de classer les moûts ou les vins les uns par rapport aux autres, du point de vue de cette acidité finale, donc de juger la matière première en vue de la choisir de telle sorte que la concentration augmente le moins possible l'acidité fixe, ce qui est particulièrement souhaitable.

L'un de nous (44) écrivait en 1956, alors que les services responsables se demandaient, sous la pression des vignerons, s'il était utile d'abaisser le degré minimum des vins dans le midi, question lourde de conséquence qui conduisait à comparer ces boissons avec celles de plus haut degré, susceptibles d'être obtenues à partir des premières, par les procédés légaux : « En définitive la *connaissance de la constitution des vins est nécessaire pour prévoir les avantages ou les inconvénients de leur concentration.* Les vins de vendanges insuffisamment mûres risquent fort de donner, par concentration par le froid, avec plus de degré, des vins trop acides dans la mesure où elles sont acides et riches en acide malique ; mais, ce qui donne de mauvais résultats dans les régions du Centre ou Septentrionales — encore faut-il voir le but poursuivi —, peut réussir avec des vins du Midi, moins acides et moins riches en acide malique.

Ce procédé doit convenir aux vins préparés à partir de raisins qui, après une pluie, ont subi un « mouillage par la racine », les enrichissant en eau et en potasse ; c'est, semble-t-il, le cas des vins insuffisamment riches en alcool, cette année, dans nos régions méridionales. »

On comprend que la prévision de l'acidité donne donc, en outre, à l'œnologue, des bases beaucoup plus sûres, sinon parfaites (voir chapitre IV) pour aider le législateur à prendre la décision la plus favorable, en ce qui concerne ce problème délicat de l'abaissement temporaire du degré minimum légal.

IV. — APPLICATION A DES MOUTS DE COMPOSITION CONNUE ET AUX VINS RÉSULTANT DE LEUR FERMENTATION

A. — Étude à partir de moûts de teneurs variées en acides organiques et en potasse.

1er ESSAI (1957).

Un moût a été réparti en divers échantillons qui ont été additionnés de quantités variées de potasse et d'acides tartrique et malique suivant le tableau XII.

L'expérience a été faite en double, avec et sans anhydride sulfureux (15 g. de SO_2hl) (1).

TABLEAU XII

Corps ajoutés en méq/l.	a	b	c
Série I. potasse	10	20	30
Série II, acide malique	20	40	60
Série III, acide tartrique.....	20	40	60

Ces moûts ont ensuite subi la fermentation alcoolique.

Les vins ont été mis en chambre froide à + 2°C après l'analyse de décembre.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

I. — Prévision de la teneur en acide tartrique.

Les teneurs en acide tartrique t_n (tableau XVI) prévues à partir du moût (tableau XIII) et à partir du vin nouveau (tableau XIV) coïncident pas mal.

(1 mmol.,5 de différence pour un échantillon ; de 0,06 à 0,7 mmol. pour les autres.)

Les teneurs de ces mêmes vins en acide tartrique en janvier 1959, soit 16 mois après la vinification (tableaux XV et XVI) sont aussi très voisines de ces prévisions : elles diffèrent, en mmol/l :

de — 1,55 à + 2,55 des prévisions faites à partir des moûts ;

de — 0,85 à + 2,67 des prévisions faites à partir des vins.

Nous avons donc pu prévoir la teneur en acide tartrique du vin d'un an 1/2 ; il aurait été intéressant de savoir à quelle date ces vins avaient atteint pratiquement leur équilibre.

(1) Les essais ont été réalisés avec levurage par addition d'un dépôt de levures Saccharomyces ellipsoïdeus sélectionnées sans avoir, au préalable, stérilisé les milieux.

TABLEAU III

ESSAI 1960. Moût.

	I			I			II		
	a KOH 10 méq/l sans SO_2	*b* KOH 20 méq/l sans SO_2	*c* KOH 30 méq/l sans SO_2	*a'* KOH 10 méq/l 15 g SO_2	*b'* KOH 20 méq/l 15 g SO_2	*c'* KOH 30 méq./l 15 g SO_2	*a* Ac. mal. 20 méq. sans SO_2	*b* Ac. mal. 40 méq. sans SO_2	*c* Ac. mal. 60 méq. sans SO_2
Alcool d° futur	9°6								
NH^3 méq./l	4,19	4,19	4,19	4,19	id.	id.	id.	id.	id.
Ca en méq/l	0,94	0,94	0,94	0,94	id.	id.	id.	id.	id.
pH	2,95	3,12	3,35	2,95	3,11	3,32	2,78	2,74	2,7
Acidité totale en méq./l	110,5	93	79	116	100,5	85,5	148,5	165	184,5
Acide malique en mmol/l	24	24	24	24	24	24	34	44	54
Acide tartrique en mmol/l	31,75	25,5	21,43	34,18	29,5	24,5	41,56	41,93	44,3
Potasse en mmol/l	19,4	21,6	27,5	20,8	25,6	30	18	18	19,4
Indice de tartre	1,63	1,18	0,77	1,64	1,15	0,61	2,3	2,33	2,28
t — p	12,35	3,9	—6,07	13,38	3,9	—5,5	23,56	23,93	24,8
tp	615,95	550,8	589,32	710,9	755,2	735	748,08	754,74	858,4
S/C à + 2°C	80	65	54	80	66	55	98	104	107
t_2	17	10,2	4,9	17,9	10,3	5,1	27,1	27,1	28,4

	II			III			III		
	a' Ac. mal. 20 méq. 15 g SO_2	*b'* Ac. mal. 40 méq. 15 g SO_2	*c'* Ac. mal. 60 méq. 15 g SO_2	*a* Ac. tart. 20 méq. sans SO_2	*b* Ac. tart. 40 méq. sans SO_2	*c* Ac. tart. 60 méq. sans SO_2	*a'* Ac. tart. 20 méq. 15 g SO_2	*b'* Ac. tart. 40 méq. 15 g SO_2	*c'* Ac. tart. 60 méq. 15 g SO_2
Alcool d° futur									
NH^3 méq./l	id.	idem	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
Ca en méq/l	id.	idem	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
pH	2,78	2,74	2,72	2,69	2,64	2,58	2,71	2,64	2,58
Acidité totale en méq./l	151,5	171,5	190,5	142	158	175,5	147	164	181,5
Acide malique en mmol/l	34	44	54	24	24	24	24	24	24
Acide tartrique en mmol/l	41,68	43,93	45,25	45,12	53,43	61,25	47,75	55,49	62,81
Potasse en mmol/l	18	19,4	20,6	13,6	12,3	10,8	14,5	13,4	11,8
Indice de tartre	2,31	2,26	2,19	3,31	4,34	5,67	3,29	4,14	5,32
t — p	23,68	24,53	24,65	31,52	41,13	50,45	33,25	42,09	51,01
tp	750,24	852,2	932,15	613,6	657,1	102,5	692,37	743,56	741,04
S/C à + 2°C	98	104	107	110	118	131	108	109	131
t_2	27,2	28,2	28,4	34,7	45,8	52,9	36,2	44,7	53,5

TABLEAU XIV

ESSAI 1960. Vins nouveaux.

	I			I			II	
	a KOH 10 méq. sans SO_2	*b* KOH 20 méq. sans SO_2	*c* KOH 30 méq. sans SO_2	*a'* KOH 10 méq. 15 g SO_2	*b'* KOH 20 méq. 15 g SO_2	*c'* KOH 30 méq. 15 g SO_2	*a* Ac. mal. 20. méq. sans SO_2	*b* Ac. mal. 40 méq. sans SO_2
Alcool	9°5	9°3	9°1	9°5	9°6	9°6	9°45	9°4
pH	3	3,28	3,51	2,9	3,09	3,28	2,83	2,8
Acidités en méq/l : totale	132	89,9	80,5	141,1	117,5	98,7	162,2	177,3
Votatile	20	18	24,4	12	11	11	18	18
Fixe	112	71,9	56,1	128,1	105,5	86,7	144,2	159,3
Acide tartrique mmol/l	32,5	22,87	18,25	33,62	25,87	19,49	40,93	42,3
Potasse mmol/l	19,4	21,1	25,4	20	22,2	26,2	18	18,3
Indice de tartre	1,67	1,08	0,71	1,68	1,16	0,74	2,27	2,3
t — p	13,1	1,77	—7,15	13,62	3,67	—7,71	22,93	23,8
tp	630,5	482,55	463,5	672,4	574,3	510,6	736,7	804
S/C à + 2°C	81	60	57	90	77	56	93	101
t_2	17,7	8,7	4,8	18,5	10,8	4,5	26,4	27,6

	II			III			III	
	c Ac. mal. 60 méq. sans SO_2	*a'* Ac. mal. 20 méq. 15 g SO_2	*b'* Ac. mal. 40 méq. 15 g SO_2	*c'* Ac. mal. 60 méq. 15 g SO_2	*a* Ac. tart. 20 méq. sans SO_2	*b* Ac. tart. 40 méq. sans SO_2	*c* Ac. tart. 60 méq. sans SO_2	*a'* Ac. tart. 20 méq. 15 g SO_2	*b'* Ac. tart. 40 méq. 15 g SO_2
Alcool	9°4	9°5	9°5	9°45	9°45	9°5	9°55	9°6	9°6
pH	2,79	2,79	2,73	2,71	2,75	2,71	2,6	2,7	2,6
Acidités en méq/l : totale	190,2	172	187	205	161	173	189	170	187
Votatile	15	10	8	10	11	10	10	6	8
Fixe	175,2	161	178	194	151	163	179	163	178
Acide tartrique mmol/l	43,74	43,5	45,31	45,87	49,31	56,37	65,93	51,62	60,05
Potasse mmol/l	19,4	20	20,6	21,7	16,1	14,5	14,6	18,3	17,2
Indice de tartre	2,25	2,17	2,20	2,11	3,06	3,88	4,51	2,82	3,52
t — p	24,34	23,5	24,71	24,17	33,21	41,87	51,33	33,32	42,85
tp	848,5	870	933,3	995,3	793,8	817,3	962,5	944,6	1032,8
S/C à + 2°C	105	101	110	115	107	112	131	114	130
t_2	28,0	27,2	28,5	28,2	36,2	44,4	53,8	36,4	45,7

ESSAI 57

TABLEAU IV

Vins d'un an (1er janvier 1959)

Mis en chambre froide à + 2 °C, le 10/12/57.

	I			I			II			II			III		
	a KOH + 10 méq. sans SO_2	*b* KOH + 20 méq. sans SO_2	*c* KOH + 30 méq. sans SO_2	*a'* KOH + 10 méq. + 15 g SO_2	*b'* KOH + 20 méq. + 15 g SO_2	*c'* KOH + 30 méq. + 15 g SO_2	*a* Ac. mal. + 20 méq. sans SO_2	*b* Ac. mal. + 40 méq. sans SO_2	*c* Ac. mal. + 60 méq. sans SO_2	*a'* Ac. mal. + 20 méq. + 15 g SO_2	*b'* Ac. mal. + 40 méq. + 15 g SO_2	*c'* Ac. mal. + 60 méq. + 15 g SO_2	*b* Ac. tart. + 40 méq. sans SO_2	*a'* Ac. tart. + 20 méq. + 15 g SO_2	*b'* Ac. tart. + 40 méq. + 15 g SO_2
Degré	9°45	9°40	9°01	9°4	9°5	9°5	9°4	9°4	9°4	9°4	9°5	9°45	9°45	9°45	9°5
pH	2,89	3,21	3,51	2,8	3	3,23	2,71	2,7	2,66	2,66	2,61	2,61	2,59	2,58	2,5
Acidités en méq./l totale	117	78	69	129	104,5	87	150	162	175	158	174	190	163	158	173
Votatile	20	18	25	9	8	11	18	18	16	10	7	9	8	7	7
Fixe	97	60	44	118,4	95,5	75	132	144	159	147	166	180	154	150	165
Acide tartrique mmol/l	18,43	10,37	5,31	19,87	12,5	6,5	26,68	29,25	28,93	29,75	30,5	30,87	44,25	36,93	46,25
Potasse mmol/l	9,43	10,58	14,45	9,26	11,81	14,87	7,39	7,90	7,65	8,24	8,24	8,37	6,71	7,22	6,54
Indice de tartre	1,95	0,98	0,36	2,14	1,05	0,43	3,61	3,70	3,78	3,61	3,70	3,73	6,59	5,11	7,07
$t - p$	+ 9	— 0,21	— 9,14	+ 10,61	+ 0,69	— 8,37	+ 19,29	+ 21,35	+ 21,28	+ 21,51	+ 22,26	+ 22,5	+ 37,54	+ 29,71	+ 39,71
tp	173,79	109,71	76,73	183,99	147,62	94,72	197,16	231,07	221,31	245,14	251,32	258,38	296,91	266,63	302,47
s/c à + 2°C	90	64	60	102	80	69	117	117	125	125	125	125	137	137	155
t_2 prévu à partir de ce vin	15	7,9	4,4	16,7	9,3	5,1	24,1	25,9	26	26,2	26,9	27,1	40,9	33,7	

TABLEAU XVI

Essais 1957.

	I			I			II			II			III		
	a	*b*	*c*	*a'*	*b'*	*c'*	*a*	*b*	*c*	*a'*	*b'*	*c'*	*b*	*a'*	*b'*
Acide tartrique final t_2 prévu à partir du moût .	17	10,2	4,9	17,9	10,3	5,1	27,1	27,7	28,4	27,2	28,2	28,4	45,8	36,2	44,7
t_2 prévu à partir du vin nouveau	17,7	8,8	4,8	18,5	10,8	4,6	26,4	27,4	28	27,2	28,5	28,2	44,4	36,4	45,7
t_2 prévu à partir du vin d'un an	15	7,9	4,4	16,7	9,3	5,1	24,1	25,9	26	26,2	26,9	27,1	40,9	33,7	
t_2 dosé après chambrage ...	18,4	10,4	5,3	12,9	12,5	6,5	26,7	29,25	28,9	29,75	30,5	30,9	44,25	36,9	46,25
Sm	+ 1,4	+ 0,2	+ 0,4	+ 2	+ 2,2	+ 1,4	− 0,4	+ 1,55	+ 0,5	+ 2,55	+ 2,3	+ 2,5	— 1,65	— 0,7	+ 1,55
Sv	+ 0,7	+ 1,6	+ 0,5	+ 1,4	+ 1,7	+ 1,9	+ 0,3	+ 1,85	+ 0,9	+ 2,55	+ 2,0	+ 2,7	— 0,25	— 0,5	+ 0,55
Sv'	+ 3,4	+ 2,5	+ 0,9	+ 3,2	+ 3,2	+ 1,4	+ 2,6	+ 3,35	+ 2,9	+ 3,65	+ 3,6	+ 3,8	+ 3,35	+ 3,2	
Acidité fixe finale prévue à partir du moût ...	110,95	92,9	77,7	115,1	96,5	79,3	146,3	160,1	174,9	149,2	165	179,9	165,5	150,7	168,4
prévue à partir du vin nouveau	97	58	42,7	113	90	71	129,7	144	160	144,7	161,2	176,4	151	148	164
dosée après chambrage	97	60	44	118,4	95,5	75	132	144	159	147	166	180	154	150	165
△m	— 13,95	— 32,9	— 33,7	+ 3,4	— 1,5	— 4,3	− 14,3	— 16	— 15,9	— 2,2	+ 1	+ 0,1	— 11,5	— 0,7	— 3,4
△v	0	+ 2	+ 1,3	+ 5,4	+ 5,5	+ 4,4	+ 2,3	0	— 1	+ 2,3	+ 4,8	+ 3,6	+ 3	+ 2	+ 1
$t - p$ moût	+ 12,35	+ 3,9	— 6,07	+ 13,38	+ 3,9	— 5,5	+ 23,56	+ 23,93	+ 24,85	+ 23,68	+ 24,53	+ 24,65	+ 41,13	+ 33,25	+ 42,09
vin nouveau	+ 13,1	+ 1,77	— 7,15	+ 13,62	+ 3,67	— 7,71	+ 22,93	+ 23,66	+ 24,34	+ 23,5	+ 24,71	+ 24,17	+ 41,87	+ 33,32	+ 42,85
vin d'un an 1/2	+ 9	— 0,21	— 9,14	+ 10,61	+ 0,69	— 8,37	+ 19,29	+ 21,35	+ 21,28	+ 21,51	+ 22,26	+ 22,5	+ 37,54	+ 29,71	+ 39,71

II. — Prévision de l'acidité.

Les acidités finales ont été prévues à partir des moûts de la façon suivante, en supposant, en particulier, que 15 p. 100 de l'acide malique ont été consommés par la levure au cours de la fermentation alcoolique :

NH_3 méq/l	4
Acide succinique 1,3 × d° p	11,4
Acide lactique	6
Acide citrique	1
Total	22,4
15 % de l'acide malique à déduire	7,2
$\triangle A_l$ =	+ 15,2

Un calcul analogue a été fait dans le cas des moûts additionnés d'acide malique.

Aux ΔA_l calculés, nous avons retranché, pour chaque vin, la perte de tartrate acide de K.

1° A partir des moûts, la prévision de l'acidité n'apparaît correcte que lorsqu'ils ont été sulfités.

L'erreur la plus élevée est alors de l'ordre de 4 méq/l, soit + 0,2 g. en SO_4H_2/l.

Dans le cas des moûts non sulfités, il a disparu plus d'acide qu'il n'a été prévu ; la différence d'acidité entre le vin de vendange sulfitée et l'autre est parfois telle qu'elle ne peut s'expliquer par la seule fermentation malolactique (vins I *b*, I *c*).

Cela conduit à penser qu'une partie de l'acide malique a été plus dégradée que ne l'indique la réaction globale de cette fermentation. La chromatographie ne fait d'ailleurs apparaître que des spots fort peu accusés d'acide lactique. On peut aussi se demander si en l'absence de SO_2, les levures ne respireraient pas davantage l'acide malique.

2° A partir du vin nouveau, la prévision est correcte : l'erreur ne dépasse pas 5,5 méq/l, soit 0,27 en g. d'SO_4H_2/l.

Le vin d'un an 1/2 contient presque toujours quelques méq. d'acidité de plus qu'il n'avait été prévu à partir du vin nouveau.

III. t — p.

Il est logique de penser que « t-p » doit croître très légèrement au cours de la fermentation alcoolique, du fait de l'assimilation de potasse par la levure, mais décroître au cours de la conservation du vin par suite de l'insolubilisation de tartrate de Ca, de l'estérification et de l'oxydation progressive de l'acide tartrique. C'est cette décroissance qui se montre nettement ici, les vins d'un an 1/2 se distinguant des vins nouveaux par

de moindres teneurs en acide tartrique alors que celles en potasse sont restées constantes ; on remarque le sens de la variation de « t-p » du vin nouveau au vin d'un an 1/2 ; cependant l'importance de cette variation paraît trop élevée, elle n'est pas générale.

Nous verrons que, dans l'expérience suivante, t-p est resté constant dans les limites des erreurs.

Les vins d'un an 1/2 paraissent très légèrement plus sursaturés (sursaturation calculée en se basant sur le t_n calculé à partir de ces vins), que ces mêmes vins étudiés en se basant sur le t_n calculé à partir du vin nouveau.

On tendrait à en déduire qu'au fur et à mesure que l'acide tartrique d'un vin s'estérifie, il devient plus sursaturé en tartrate acide de potassium. Ce serait absurde.

Il serait plus logique de dire, si l'on était certain que les erreurs de dosage le permettaient, que l'acide tartrique décroissant un peu plus que la potasse, la teneur du liquide en acide tartrique qui devra exister à l'équilibre diminue légèrement tandis que celle en potassium croît.

Pour ce qui a trait à la légère sursaturation apparente du vin, nous verrons plus loin l'interprétation que l'on peut en faire.

2e ESSAI (1958).

A partir d'un moût dont la composition est donnée dans le tableau XVII ont été préparés des moûts dilués de 5 p. 100 additionnés, au cours de cette opération, de quantités connues d'acide malique, d'acide tartrique ou de potasse. Leur composition est donnée dans ce même tableau.

Notons que, par erreur, le moût témoin fut le moût originel au lieu d'être le moût dilué à 5 p. 100.

Il comporte d'autre part, les teneurs prévues t_8 et t_2 en acide tartrique des vins futurs, une fois stabilisés à 8°C et à 2°C, ainsi que leur acidité fixe.

Tous ces moûts furent vinifiés en bonbonnes ; une fois l'analyse des vins réalisée (tableau XVIII), après stockage au laboratoire vers 17°C, ils furent conservés en bouteilles, une partie à 8°C, le reste à 2°C, à partir du 25/2/59.

Interprétation des résultats.

1° *Acide tartrique.*

Un bon accord existe entre les prévisions faites à partir du moût et à partir du vin nouveau.

Après chambrage à 8 et 2° pendant environ 9 mois, les vins semblent encore très légèrement sursaturés si on les compare à des solutions hydro-

ESSAI 1958

Tableau XVII

MOÛTS DILUES et ADDITIONNES des CORPS SUIVANTS

	Acide tartrique 57 méq/l	Acide tartrique 28,5 méq/l	Acide malique 57 méq/l	Acide malique 28,5 méq/l	témoin	KOH 14,25 méq/l	KOH 28,5 méq/l
Densité					1 080,5		
Sucres G. B.	176	176	176	176	184,5	176	176
Degré futur	10°7	10°7	10°7	10°7	11°2	10°7	10°7
NH_3 en mmol/l	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4
pH	2,7	2,85	2,8	2,9	3,02	3,3	3,6
Acidité totale en méq/l	153	124,5	153	124,5	101	81,75	67,5
Acides :							
malique en mmol/l	24,7	24,7	53,2	38,95	26	24,7	24,7
tartrique en mmol/l	64	49,75	35,5	35,5	37,31	35,5	35,5
Potasse en mmol/l	33,25	33,25	33,25	33,25	35,04	47,5	61,75
Indice de tartre					1,06		
t-p	30,75	16,5	2,25	2,25	2,27	— 12,0	— 26,25
tp					1 307,34		
s/c à 8°C	176	147	155	140	120	93	80
à 2°C	97	81	87	76	67	51	48
t_8	35,6	22,9	13,6	13	12,1	5,3	2,7
t_2	33,6	20,46	10,5	9,9	9,4	3,3	1,7

alcooliques de mêmes degrés alcoolique et centigrade : ils contiennent de 0 à 4,7 mmol. d'acide tartrique de plus.

Mais si l'on tient compte de ce que leur force ionique est plus élevée que celle de ces solutions, on conçoit qu'ils puissent contenir à l'équilibre quelques mmol. de plus de ce composé.

Etant donnée une solution hydroalcoolique (10°2) saturée de t. ac. de K. à + 2°C, calculons le produit de solubilité K'_s aux forces ioniques minimum, moyenne et maximum des vins (0,016 ; 0, 038 ; 0,056), évaluées par Berg H. W. et Keefer R. M. (22).

Nous pouvons écrire :

$$K'_s = K_s \times \frac{\gamma' TH^- \gamma K^+}{\gamma' TH^- \gamma' K^+} = K_s \times \frac{\gamma_i^2}{\gamma'^2_i}$$

La solution hydroalcoolique saturée de tartrate ac. de K ayant la

ESSAI 1958

TABLEAU XVIII

Vin nouveaux

Date de vinification : septembre-octobre 1958. Date des analyses : décembre 1958-janvier 1959.

	Vinifiés avec 5 g SO_2/hl							Vinifiés avec 15 g SO_2/hl						
	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30 méq/l	Acide malique 60 méq/l	Acide malique 30 méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30 méq/l	Acide malique 60 méq/l	Acide malique 30 méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l
Densité	994,2	993,4	994	993	991,6	993,3	992,5	994,7	993,6					
Degré	10°7	10°7	10°7	10°7	11°2	10°55	10°6	10°7	10°7	10°6	10°7	11°2	10°7	10°7
pH	2,8	2,95	3,02	3,1	3,15	3,5	3,99	2,72	2,9	3	3,05	3,1	3,41	3,67
Acidités :.														
totale en méq/l	156	129	155	131	109	92	65	157	131	159	126	118	90	70
volatile en méq/l	10	8,5	12	8,7	11,2	15,3	25,1	7,3	6,5	13,6	8	0,80	14,4	23,6
fixe en méq/l	145,2	119,9	141,8	121,3	97,2	76,1	39,9	147,2	121,9	142,9	114	99,5	72,1	43,27
Acide tartrique en mmol/l	45,12	31,37	25,25	23,0	20,37	13,37	10,18	45,25	33,06	23,56	22,06	20,31	11,68	8,37
Potasse en mmol/l	14,02	15,93	22,09	21,03	20,18	27,83	39,75	14,44	16,90	20,18	19,23	19,01	24,86	35,7
Indice de tartre	3,21	1,96	1,14	1,09	1	0,48	0,25	3,13	1,95	1,16	1,14	1,06	0,46	0,23
t-p	31,10	15,44	3,16	1,97	0,19	—14,46	—29,55	30,81	16,16	3,38	2,83	1,30	— 13,18	— 27,33
tp	632,58	499,72	557,77	483,69	411,06	372,08	404,45	653,41	558,71	475,44	424,21	386,09	290,36	138,15
s/c														
à + 8°C	158	133	123	107	100	84	90	177	142	130	118	107	86	79
à + 2°C	88	72	67	59	55	49	59	97	77	69	64	59	54	49

TABLEAUX XIX

ESSAIS 1958 Vins d'un an.

Date des vinifications : octobre 1958. Date de chambrage : 25 février 1959. Date des analyses : 1 décembre 1959.

I. — Chambrage à 8°C

	Vinifiés avec 5 g SO_2/Hl							Vinifiés avec 15 g SO_2/Hl						
	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60méq/l	Acide malique 30 méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60 méq/l	Acide malique 30méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l
Degré	10°6	10°6	10°6	10°7	11°2	10°3	10°6	10°6	10°6	10°6	10°75	11°2	10°85	10°65
pH	2,78	2,91	3,1	3,2	3,24	3,6	4	2,75	2,89	3,01	3,09	3,11	3,48	3,97
Acidités :														
totale en méq/l	145	121	119	100	88	79	65	150	123	152	121,5	112	86	65,5
volatile en méq/l	10,75	13	18,75	16	14	30,5	30,75	13,2	11,5	14,6	8	16,7	15,9	23,8
fixe en méq/l	134,25	108	100,25	84	74	48,5	34,25	134,5	109	135	110,5	92,5	66,5	39
Acide tartrique en mmol/l	38,37	25,5	14	14,31	13,18	6,12	5,43	37,81	25,93	18,12	17,5	15,68	8	4,5
Potasse en mmol/l	9,35	10,49	14,02	13,17	13,17	21,25	34	9,43	10,62	13,81	14,02	13,17	19,97	32,3
Indice de tartre	4,10	2,43	1	1,08	1	0,28	0,16	4	2,44	1,31	1,24	1,19	0,40	0,44
t-p	29,02	15,01	— 0,02	1,14	0,01	— 15,13	— 28,57	28,38	15,31	4,31	3,48	2,51	— 11,97	— 27,8
tp	358,75	267,5	196,3	188,46	173,6	130,05	184,62	356,54	275,37	250,23	245,35	206,50	159,76	145,35
s/c à + 8°C	166	146	114	99	92	84	90	170	145	129	112	105	92	85
Acide malique	++	++	+++	+	traces	0	0	++	++	++++	+++	++	++	0
Acide lactique	+	+	+	+	++	++	traces	+	+	+	+	+	+	++
Acide tartrique	++++	+++	++	++	++	+	traces	++++	+++	++	++	++	+	traces

Tableaux XIX *(suite)*

II. — Chambrage à 2°C

	Vinifiés avec 5 g SO_2/Hl							Vinifiés avec 15 g SO_2/Hl						
	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/	Acide malique 60méq/l	Acide malique 30 méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60 méq/l	Acide malique 30méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l
Degré	10°6	10°6	10°7	10°85	11°2	10°5	10°6	10°6	10°6	10°6	10°75	11°2	10°85	10°65
pH	2,7	2,87	3,02	3,04	3,11	3,6	4,01	2,7	2,85	3	3,05	3,1	3,47	4
Acidités :														
Totale en méq/l	145	119	116	123	99	74,5	64	146	124	150	118,5	109	83	66
volatile en méq/l	15,5	15,5	20,25	21,5	14	28,75	31	9,1	11,4	13,4	7,55	14	15,1	23,2
fixe en méq/l	129,5	103,5	95,75	101,5	85	45,75	33	134,75	109,75	133,75	108,5	92,5	64,75	39,5
Acide tartrique en mmol/l	35,25	22,81	12,56	12,5	12,24	3,93	2	35,81	23,56	14,87	13,87	12,68	4,87	1,75
Potasse en mmol/l	6,71	7,73	10,79	10,92	11,43	18,48	31,02	7,01	7,89	11,48	11,42	11,42	17,64	29,86
Indice de tartre	5,25	2,95	1,16	1,14	1,07	0,21	0,06	5,10	2,98	1,29	1,21	1,11	0,27	0,058
t-p	28,54	15,08	1,77	1,58	0,81	— 14,55	— 29,02	28,8	15,67	3,39	2,45	1,26	—12,77	— 28,11
tp	236,52	176,32	135,5	136,5	139,9	72,62	62,04	251,02	185,88	170,70	158,39	144,80	85,9	52,25
s/c à + 2°C	100	82	63	67	57	49	60	100	84	69	64	58	44	59
Acide malique	++	++	+++	++++	++	o	o	++	++	++++	+++	++	++	o
Acide lactique	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+
Acide tartrique	++++	+++	++	++	++	+	traces	++++	+++	++	++	++	+	o

Tableau XX

Prévisions et résultats analytiques correspondants.

	I. — Chambrage à 8°C													
	5 g SO_2/hl au moût							15 g SO_2/hl au moût						
	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60méq/l	Acide malique 30 méq/	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60 méq/l	Acide malique 30méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l
Acide tartrique final														
t_8 prévu à partir du moût	35,6	22,9	13,6	13,0	12,13	5,3	2,7	35,6	22,9	13,6	13,0	12,13	5,3	2,7
t_8 prévu à partir du vin nouveau	35	21,59	12,77	11,37	10,09	4,44	2,78	35,76	22,47	13,21	12,37	11	4,78	2,63
t_8 prévu à partir du vin d'un an..	33,9	21,72	10,67	10,53	9,59	4,32	2,66	33,51	21,92	13,71	12,46	17	5,3	2,73
t_8 dosé après chambrage...	38,37	25,5	14	14,31	13,18	6,12	5,43	37,81	25,93	18,12	17,51	15,68	8	4,5
Sm	+ 2,8	+ 2,6	+ 0,4	+ 1,3	+1,05	+0,8	+2,7	+ 2,2	+ 3	+ 4,5	+ 4,5	+3,5	+ 2,7	+ 1,8
Sv	+ 3,4	+ 3,9	+ 1,2	+ 2,9	+3,1	+ 1,7	+ 2,6	+ 2,1	+ 3,46	+ 4,9	+ 5	+4,6	+ 3,2	— 0,8
Sv^1	+ 4,4	+ 3,8	+ 3,3	+ 3,8	+3,6	+ 1,8	+ 2,7	+ 4,3	+ 4	+ 4,4	+ 5	—1,3	+ 2,7	+ 1,8
Acidité fixe finale prévue à partir du moût	139,6	112,7	137,4	112,6	93,4	66,5	49,7	139,6	112,7	137,4	112,6	93,4	66,5	49,7
prévue à partir du vin nouveau	135,1	110,1	129,4	109,7	86,92	67,2	33,6	137,7	111,3	132,6	105,7	90,2	65,2	37,6
dosée après chambrage ..	134,25	108	100,25	84	74	48,5	34,25	134,5	109	135	110,5	92,5	66,5	39
△m	— 5,35	— 4,7	—37,2	— 28	—19,4	—18	—15,5	— 5,1	— 3,7	— 2,4	— 2,1	—0,9	0	—10,7
△v	— 0,9	— 2,1	—29,2	— 25,7	—12,9	—18,7	+ 0,6	— 3,2	— 2,3	+ 2,4	+ 4,8	+2	+ 1,3	+ 1,4
t-p														
moût								30,75	16,5	2,25	2,25	2,25	—1 2	—26,25
vin nouveau								30,81	16,16	3,38	2,83	1,30	—13,18	—27,33
vin d'un an	29	15	—0,02	1,14	0,01	—15,13	— 28,57	28,38	15,31	4,31	3,48	2,51	—11,97	—27,8

Tableau XX *(suite)*

II. — Chambrage à 2°C

	5 g SO_2/hl au moût							15 g SO_2/hl au moût						
	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60méq/l	Acide malique 30 méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l	Acide tartrique 60 méq/l	Acide tartr. 30méq/l	Acide malique 60 méq/l	Acide malique 30méq/l	Témoin	KOH 15 méq/l	KOH 30 méq/l
Acide tartrique final														
t_2 prévu à partir du moût	33,63	20,46	10,52	9,91	9,44	3,32	1,71	33,63	20,46	10,52	9,91	9,44	3,32	1,71
t_2 prévu à partir du vin nouveau	33,71	19,19	9,91	8,73	7,51	2,83	1,88	33,68	20,01	10,17	9,54	8,67	3,28	1,69
t_2 prévu à partir du vin d'un an	31,69	19,32	8,87	9,01	7,96	2,82	1,93	31,92	19,89	10,17	9,31	8,27	2,82	1,96
t_2 dosé après chambrage	35,25	22,81	12,56	12,5	12,24	3,93	2	35,81	23,56	14,87	13,87	12,68	4,87	1,75
Sm	+ 1,6	+ 2,4	+ 2	+ 2,6	+2,8	+ 0,6	+ 0,3	+ 2,18	+ 3,1	+ 4,3	+ 4	+3,2	+ 1,5	0
Sv	+ 1,5	+ 3,6	+ 2,6	+ 3,8	+4,7	+ 1,1	+ 0,1	+ 2,1	+ 3,5	+ 4,7	+ 4,3	+4	+ 1,6	0
Sv'	+ 3,6	+ 3,5	+ 3,7	+ 3,5	+4,3	+ 1,1	+ 0,1	+ 3,9	+ 3,6	+ 4,6	+ 4,5	+4,4	2	0
Acidité fixe finale														
prévue à partir du moût	137	110,2	134,3	109,5	90,7	64,7	48,7	137	110,2	134,3	109,5	90,7	64,7	48,7
prévue à partir du vin nouveau	133,8	97,7	126,5	107	84,3	65,5	32	135,6	108,9	129,5	102	96,9	63,7	36,6
dosée après chambrage	129,5	103,5	95,75	101,5	85	45,75	33	134,75	109,75	133,75	108,5	92,5	64,7	39,5
$\triangle$m	— 7,5	— 6,7	—38,55	— 8	—5,7	— 19	—15,7	— 2,3	— 0,5	— 0,5	— 1	+1,8	0	— 9,2
$\triangle$v	— 4,3	+ 5,8	—30,58	— 5,5	+0,7	— 19,75	+ 1	— 0,85	+ 0,85	+ 4,25	+ 6,5	—4,4	+ 1	+ 2,9
t-p														
moût								30,75	16,5	2,25	2,25	2,25	— 12	—26,25
vin nouveau								30,81	16,16	3,38	2,83	1,30	—13,18	—27,33
vin d'un an	28,54	15,08	1,77	1,58	0,81	—14,55	—29,02	28,8	15,67	3,39	2,45	1,26	—12,77	—28,11

Tableau XXI.

	Solution hydroalcool saturée à 18°C $10^{o}2$, pH 3,5	Même solution saturée		VIN		
		+ 25 mmol. d'acide malique + 17 mmol. NaOH/l	+ 50 mmol. d'acide malique + 34 mmol. NaOH/l	minimum	moyenne	maximum
t. ac. K mmol./l	14,87 ± 0,13	16,5 ± 0,25	18 ± 0,5			
ac. t mmol/l	14,87					
K mmol./l	14,87					
pH	3,5					
μ	0,017	0,035	0,052	0,016	0,038	0,056
γi	0,859	0,806	0,763	0,8646	0,7989	0,7676
K_s	$10{,}11.10^{-5}$	$11{,}02.10^{-5}$	$11{,}75.10^{-5}$			
Par le calcul à partir de	$10{,}11.10^{-5}$ on a	$11{,}55.10^{-5}$	$12.88.10^{-5}$	$10{,}039.10^{-5}$	$11{,}88.10^{-5}$	$12{,}90.10^{-5}$
$\frac{s}{c}$	221	252	281	218	255	281
$\sqrt{\frac{s}{c}}$	14,87	15,84	16,73	14,77	15,98	16,76
t résultant de l'analyse	14,87	16,5	18			

composition indiquée dans la colonne 1 du tableau XXI, déduisons en les valeurs de $\frac{s}{c}$ dans le vin par la relation :

$$\frac{s'}{c'} = \frac{s}{c} \times \frac{\gamma^2}{\gamma'^2}$$

elles sont indiquées dans ce même tableau.

En définitive, l'augmentation de la solubilité du tartrate acide de K correspondant à la différence de force ionique entre la solution hydroalcoolique 10°, saturée pure à 2°C, de ce sel acide (pH 3,5 environ) et les forces ioniques moyenne et la plus élevée des vins est de l'ordre de 1 et 2 mmol/l.

Par suite, lorsque l'excès d'acide tartrique d'un vin de pH 3,5 sur la teneur de la solution hydroalcoolique saturée aux mêmes degrés alcoolique et centigrade ne dépasse pas 2 mmol/l, on doit considérer que le vin a atteint son état d'équilibre du point de vue considéré.

En admettant que la variation de $\frac{s}{c}$ de la solution hydroalcoolique au vin soit du même ordre tout le long de la courbe des $\frac{s}{c}$, construite en fonction des pH, le terme t prenant, dans le produit tp, relativement plus d'importance au fur et à mesure que le pH s'abaisse, l'effet de la différence entre la force ionique des vins et celle des solutions hydroalcooliques de tartrate ac. de K de même pH sur la solubilité « de l'acide tartrique en présence du potassium » devrait croître avec l'abaissement du pH. C'est bien ce que l'on constate dans l'ensemble, dans le cas des vins sulfités : mais la différence apparaît très faible.

Les vins en question paraissent bien avoir atteint leur état d'équilibre (depuis environ 200 jours dans le cas du témoin d'après le graphique VI qui donne la variation de sa teneur en acide tartrique avec le temps, soit 80 jours après le début du chambrage à 2°C. Il est vrai qu'ils avaient alors déjà perdu une partie de leur tartrate acide de K).

2° *Acidité fixe.*

Le calcul de l'acidité fixe future des vins à partir des moûts a été fait pour les différents moûts, comme nous l'avons indiqué au chapitre V (voir le tableau XXII).

Parallèlement à l'expérience précédente (vins de moûts sulfités et de moûts non sulfités), il faut ici distinguer les vins de moûts sulfités à raison de 15 g. de SO_2 hl des échantillons peu sulfités (5 g/hl).

Pour les premiers, les prévisions, qu'elles fussent effectuées à partir des moûts ou des vins, sont correctes : mis à part les vins n°7 de pH particulièrement élevés ; les différences avec les résultats des dosages atteignent au maximum 6,5 méq/l, soit 0,3 g d'SO_4H_2/l.

TABLEAU XXII

	Témoin	Pas d'addition d'ac. malique	Addition de 28,5 méq. d'acide malique/l	Addition de 57 méq. d'acide malique/l.
NH^3	1,5		1,4	
Ac. succinique : 1,3 × 11	16,5	1,3 × 10,7 =	13,9	
Ac. lactique.....	6		6	
Ac. citrique.....	1		1	
	25		22,3	22,3
Ac. malique : 0,15 × 2 × 26 =	— 7,8	— 7,4	— 11,7	— 16
Augmentation d'acidité du à la levure	17,2	14,9	10,6	6,3

Dans le cas des échantillons peu sulfités, les prévisions sont le plus souvent erronées ; elles aboutissent à des nombres plus élevés que les résultats analytiques.

Lorsque les prévisions ont été faites à partir des vins, les différences sont importantes surtout pour les liquides conservés à 8°C, et parmi ces derniers pour ceux de pH ⩾ 3,1, sauf cependant pour celui de pH 4 ; elles le sont aussi pour les vins à 2°C n° 3 de pH 3,07 et n° 6 de pH 3,6.

A partir des moûts, les différences sont encore plus grandes, l'inexactitude s'étendant aux vins de pH 4.

Cela peut s'interpréter de la façon suivante :

Les différences entre la prévision et le résultat analytique du vin d'un an correspondent à une plus grande décomposition d'acide malique par respiration de la levure ou par fermentation malolactique.

Lorsque les prévisions à partir des vins nouveaux sont exactes alors que celles à partir du moût ne le sont pas, c'est que l'acide malique détruit, l'était déjà lors de l'analyse du vin nouveau.

On comprend qu'en présence de faibles doses de SO_2, l'acide malique ait pu être plus détruit et qu'à 8°C, à fortiori, au lieu de 2°C, la fermentation malolactique ait pu se poursuivre (quoique cette température soit normalement considérée comme défavorable aux ferments malolactiques), alors qu'à + 2°C, elle ait été rapidement stoppée.

La plus grande partie de l'acidité a disparu pendant le chambrage des vins à 8°C dans les vins de pH ⩾ 3,1 ; sauf dans ceux de pH 4 (peu de perte d'acide malique, apparemment, dans les vins de pH < 3,1); cette dégradation était déjà produite lors de l'analyse des vins nouveaux, dans le cas des échantillons 7' et 7 de pH 4.

Remarquons que c'est bien pour les vins dont les moûts avaient été additionnés d'acide malique que l'erreur est la plus grande.

Si nous comparons maintenant notre interprétation précédente avec les résultats d'analyse chromatographique des vins d'un an (tableau

XIX) (Méthode Pascal Ribéreau-Gayon), on constate bien la diminution ou la disparition de l'acide malique dans les vins déjà remarqués à cet égard. Il faut évidemment tenir compte de ce que certains moûts avaient été enrichis en cet acide. Les spots de l'acide lactique, d'ailleurs confondus avec ceux de l'acide succinique, n'ont pas permis d'interprétation nette.

Etant donné que les nombres utilisés au calcul de l'influence de la levure sur l'acidité ne sont que des moyennes et peuvent varier pas mal (c'est plus particulièrement le cas de l'ac. malique), on est conduit à s'étonner d'avoir pu si bien prédire l'acidité fixe du vin à partir du moût primitivement additionné de 15 g de SO_2 par hl.

Quoique ces essais soient apparemment probants, on ne peut donc être certain d'aboutir toujours à de si bons résultats, même si le moût a été convenablement sulfité.

Par ailleurs, il conviendrait de s'assurer de l'application de ces calculs dans le cadre d'essais réalisés dans de grandes cuves en corrigeant éventuellement le pourcentage adopté, relatif à l'acide malique détruit par les levures.

L'essai de cette prévision dans le cadre de la grande pratique est donc nécessaire, quitte à adopter pour l'avenir, en fonction des résultats, les modalités du calcul aux nouvelles conditions de fermentation.

3° « t-p ».

Est pratiquement resté constant.

4° *Teneurs en Acide tartrique et Acidité fixe* des vins de moûts plus ou moins sulfités.

En comparant les vins de vendanges sulfitées à raison de 5 g et de 15 g/hl., on s'attend à trouver plus d'acide tartrique dans les derniers, et plus d'acide tartrique t_n prévu.

Il n'en est pas toujours ainsi lors de l'analyse des vins jeunes, qui ont été faits à un mois d'intervalle, mais les t_n prévus concordent à cet égard.

Il en est bien ainsi à l'équilibre, mais plus ou moins nettement.

On peut dire qu'en présence de plus de SO_2, en l'absence de matières solides, il y a augmentation importante d'acidité fixe par protection de l'acide malique, mais beaucoup moins (pas du tout à pH 4) du fait d'une plus grande solubilité du tartrate acide de K.

3e ESSAI

Un essai analogue aux précédents, mais dont tous les moûts avaient été sulfités, sauf un double du témoin, a été préparé en 1952, les vins ayant été analysés après 4 mois de chambrage à 20C, puis beaucoup plus tard, en 1957.

La prévision de l'acide tartrique par le calcul direct (avec $p\,K_1 = 3{,}01$ et $p\,K_2 = 4{,}05$) et au moyen des courbes $\frac{s}{c}$ en fonction du pH, se montrèrent très voisines.

Au bout de 4 mois de chambrage, l'équilibre paraissait réalisé avec une légère apparente sursaturation, comme dans les essais précédents.

Une légère baisse de la différence t-p fut constatée comme dans l'essai n°1, mais plus explicable ici du fait de la longue durée de stockage du liquide laissant aux réactions d'estérification le temps de se produire.

Il nous a paru inutile de surcharger le texte par les résultats analytiques de cette série d'échantillons, moins complète que celles dont nous venons de donner le détail.

B. — Vinification de vendanges d'origines différentes.

Etant donné que nous avons parfois, et d'ailleurs exprès, modifié de façon exagérée la composition du moût mis en fermentation, il n'est peut-être pas inutile de donner, à côté des témoins des essais précédents, des exemples d'autres moûts non spécialement traités.

On sait que leur composition dépend plus particulièrement des conditions climatiques de l'année, du terrain et de la date de la cueillette.

Ayant remarqué la teneur particulièrement grande en potasse des moûts des vignes cultivées sur sables calcaires de Camargue, nous avons comparé un moût d'une telle origine (Pin Fourcat) avec le produit de vignes de coteaux (sables et graviers quartzeux fluviatiles du Pliocène supérieur) (Pomerols, Hérault) Tableau XXIII. (1)

Le tableau XXIV donne les résultats des calculs de prévision. L'acide tartrique final à + 2°C a été correctement prévu. L'acidité fixe finale à + 2°C l'a aussi été dans le cas des vins de moût sulfité, avec cependant une erreur un peu élevée pour le vin de Pomerols à partir du moût.

Elle a été trouvée par l'analyse, comme nous pouvions nous y attendre, plus basse lorsqu'il n'y a pas eu de sulfitage.

La teneur des moûts en acide malique permet d'expliquer cette différence par la fermentation malolactique de l'acide malique initial.

Remarquons que ces moûts étaient, cette année, d'acidité particulièrement élevée (7 g. en SO_4H_2/l), riches en acide malique.

(1) Les vins de Jarras et du Bosquet, domaine de la Sté des Salins du Midi près d'Aigues-Mortes ont des caractéristiques analogues à ceux de Pin Fourcat, du point de vue de l'indice de tartre.

Le vin provenant de la cave coopérative de Pomerols, il est difficile de préciser parfaitement le terrain sur lequel a végété la vigne ayant fourni la vendange qui a servi à l'élaborer.

La différence entre les vins doit surtout venir du niveau d'eau ou d'une rétention différente de la potasse suivant la nature du sol.

Nous remercions MM. Coste (St-Gobain), Renaud et Jullian (Salins du Midi), Vivien et Magnet (Institut Coopératif du Vin), des moûts et des vins qu'ils nous ont aimablement fournis.

TABLEAU XXIII

Vinification en rosé (bonbonnes) Sept. 1957. Analyse des vins nouveaux, Chambrage 21 Novembre 57. Analyse des vins d'un an 1/2 : 27 Févr. 59

	POMEROLS					PIN FOURCAT				
	Moût	Vins nouveaux		Vins d'un an 1/2		Moût	Vins nouveaux		Vins d'un an 1/2	
		a	*b*	*a*	*b*		*a*	*b*	*a*	*b*
Sucres G. B.	200,5					185				
Degré alcool réel ou en p.	11,8	11,7	11,8	11,8	11,8	10,9	11	11	11,1	11,1
NH_3 mmol/l	4					4,5				
Ca mat./l.	0,32					0,38				
pH	3	3	2,8	2,9	2,75	3,22	3,35	3,12	3,35	3,1
Acidités en méq./l. :										
totale	147,5	132	159	106	152	138,4	92	136	83	127
volatile		6,7	6,2	7,2	13,6		7	7,2	10	11
fixe		126	146	100	138		82,5	127	74	114
Acides en mmol/l.										
malique	45					56				
tartrique	38,4	35	35,9	21,4	23,5	32,4	19,2	21,4	8,5	7
Potasse en mmol/l	22,4	18,9	19,4	8,3	10,2	38,2	29,4	28,8	20,4	18,3
Indice de tartre	1,7	1,8	1,8	2,5	2,3	0,8	0,7	0,7	0,4	0,4
t — p	16	16,1	16,5	13,1	13,3	— 5,8	— 10,2	— 7,4	— 11,9	— 11,3
tp	860	661	696	177	239	1242	562	622	173	128
s/c à 2°C	62	62	79	75	85	54	48	57	63	84
s/c à 24°C	480	485	635	345	690	425	380	455	375	460
s/c à 8°C	110	111	139	126	147	95	86	105	85	106
t_2	19,2	19,6	20,3	17,4	18	4,6	3,5	4,7	4	5,2
t_{24}	31,37	31,5	34,76	26,24	33,74	17,92	15,05	17,95	14,31	16,54
t_8	21,19	21,3	22,64	19,54	20,48	7,15	5,5	7,2	5	6,1

a : vinifiés sans SO_2. *b* : vinifiés avec 15 g SO_2/hl.

TABLEAU XXIV

VINS D'UN AN

	Pomerols		Pin Fourcat	
	a	b	a	b
Acide tartrique final à + 2°C				
prévu à partir du moût	19,2		5	
prévu à partir des vins nouveaux	19,6	20,3	3,5	4,7
prévu à partir des vins d'un an	20,3	17,4	4	5,2
dosé aprés chambrage à 2°C	21,4	23,5	8,5	7
Sm	+ 2,2	+ 4,3	+ 3,5	+ 2
Sv'	+ 1,8	+ 3,2	+ 5	+ 2,3
Sv''	+ 1,1	+ 6,1	+ 4,5	+ 2,2
Acidité fixe finale à + 2°C				
prévue à partir du moût	128,3		III	
prévue à partir du vin nouveau	96	138,7	66,8	110,3
dosée après chambrage	100	138	74	114
Δm en méq/l	— 38,3	+ 9,7	— 44,2	— 0,7
Δv en méq/l	+ 4	— 0,7	— 66,8	+ 3

Sm : sursaturation apparente (calcul à partir du moût)
Sv' : sursaturation apparente (calcul à partir du vin nouveau)
Sv'' : sursaturation apparente (calcul à partir du vin à l'équilibre)
Δm : erreur de prévision de l'acidité à partir du moût
Δv : erreur de prévision de l'acidité à partir du vin nouveau.

Pomerols et Pin Fourcat ont des moûts typiquement différents.

Si l'on ne considère que l'analyse normalement effectuée dans les caves : densité et acidité totale, ils diffèrent de façon assez limitée : le moût de Pomerols a cependant presque un degré de plus et une acidité totale très légèrement plus élevée (0,3 de plus en g. d'SO_4H_2 par litre).

Si l'on envisage les autres résultats analytiques, on constate que le moût de Pin Fourcat contient plus d'acide malique que l'autre alors que ce dernier a un peu plus d'acide tartrique et un pH plus faible.

Mais, ce qui distingue particulièrement ces deux moûts, ce sont leurs teneurs en potasse, leur indice de tartre (supérieur ou inférieur à l'unité suivant le cas), et leur « t-p » (positif ou négatif suivant le moût).

Il en résulte des différences dans leur évolution : à stabilité à 2°C, les vins rosés de Pomerols de vendanges sulfitées ont une acidité fixe de 25 méq /l (1,2 g/l en SO_4H_2) plus élevée que celle de Pin Fourcat, alors que la différence d'acidité de leurs moûts n'était que de 9 méq/l ; ils contiennent beaucoup d'acide tartrique et très peu de potasse, alors que c'est l'inverse dans les vins de Pin Fourcat.

La quantité de tartre insolubilisé a été plus élevée dans les vins de Pin Fourcat que dans ceux de Pomerols.

Cela étonnera peu, étant donnés les travaux de VENTRE et BOUFFARD et de FONZES-DIACON, relatifs aux vins riches en potasse.

Remarquons que l'on n'avait pas, jusqu'à ce jour, la possibilité de

tirer parti de ces notions pour agir favorablement et sélectivement au cours même de la vinification ; certains se méfiaient de ce cas-là, peut-être plus souvent même qu'il n'était utile, parce qu'ils n'avaient pas la possibilité d'en prévoir la gravité relative ; d'autres ne s'en préoccupaient pas assez.

Etant donnée l'acidité finale prévue, relativement élevée de ces vins de vendange sulfitée (6,8 g. et 5,4 g en SO_4H_2/l) on peut conclure qu'il est préférable de les sulfiter peu et de favoriser la fermentation malolactique. L'acidité élevée des moûts y aurait d'ailleurs encouragé, mais sans certitude.

En fonction des conditions météorologiques variables des régions méditerranéennes, il est logique de penser que, certaines années, les moûts de Pomerols et ceux de Pin Fourcat, même s'ils sont apparemment peu différents l'un de l'autre, peuvent se trouver de part et d'autre de la ligne de démarcation, entre les moûts dont il y a intérêt à protéger l'acidité et ceux dont il y a avantage à favoriser la désacidification (ou tous les deux de l'autre côté de cette ligne).

La connaissance de l'acidité du moût peut alors non seulement ne pas suffire, mais même induire en erreur.

La prévision de l'acidité permet par contre de se rendre compte de la façon dont il y a intérêt à conduire la vinification.

En 1953 (tableau XXV), avec le même degré alcoolique en puissance qu'en 1957, les moûts de Pin Fourcat avaient une acidité totale plus faible

TABLEAU XXV

PIN FOURCAT 1953

	Moûts		Vins rosés		Vins rouges	
	T	NPK	T	NPK	T	NPK
Sucres réfract.	188,4	209,7				
Degré en p.	11,1	12,3				
Degré alcoolique			11	12,3	10,45	11,6
pH	3,25	3,3	3,2	3,25	3,4	3,45
Acidités :						
totale en g/l	5,4	5,5	5,5	5,5	4,6	4,15
en méq/l	110,2	112,2	112,2	112,2	93,8	84,6
volatile en gr/l			0,35	0,31	0,35	0,29
en méq/l			6,8	5	6,8	5
fixe en gr/l			5,15	5,19	4,25	3,86
en méq/l			105,4	107,2	87	79,6
Acide tartrique en mmol/l	10	13	10,5	8,5	6,5	5
Potasse —	23,5	31,5	21,8	24,3	47,3	44,7
Indice de tartre	0,42	0,41	0,48	0,36	0,14	0,09
t-p	— 13,5	— 18,5	— 11,3	— 15,8	— 40,8	— 39,7
s/c à 24°C	400	350	425	360	365	330
s/c à 8°C	92	76	97	79	90	75
s/c à 2°C	48	44	53	50	49	45
$t//_{24}$	14,3	11,6	15,7	12,6	7,5	7
$t/_8$	5	3,5	5,7	4	2,1	1,9

de plus d'un g. par litre, exprimée en acide sulfurique. Ce n'était néanmoins par une acidité basse (5 g, 5). Leurs indices de tartre étaient encore inférieurs à 1, ils étaient même particulièrement faibles (0,3 à 0,4); ces moûts contenaient en effet très peu d'acide tartrique, mais beaucoup de potasse.

Compte tenu du degré, l'observation de l'acidité totale du moût aurait pu faire souhaiter une fermentation malolactique.

L'existence de fortes doses de potasse aurait pu faire craindre par contre, une forte baisse d'acidité par cristallisation de tartrate acide de potassium.

Or, comme nous allons le voir, aucun de ces phénomènes, quoiqu'ils ne soient pas parallèlement souhaitables, n'était à envisager dans ce cas particulier.

A l'analyse des vins (6 avril 1954, donc l'hiver passé), après simple conservation au cellier du laboratoire, l'acidité fixe était presque aussi élevée que celle des moûts correspondants.

Cela s'explique par le fait que, malgré leur teneur élevée en potasse, leur constitution était telle qu'ils ne pourraient être le siège d'une cristallisation importante de tartrate acide de K.

La prévision de l'acide tartrique à l'équilibre des vins à 24°C puis à 8°C (tableau XXV, dernières lignes) conduit, en effet à s'attendre à ce que le vin ne soit pas saturé en tartrate acide de K à 24°C et à ce qu'il ne le soit que légèrement à 8°C.

La quantité de tartrate acide de K susceptible de cristalliser à une température donnée est, nous l'avons vu, fonction de divers facteurs : la concentration en K en est certes une importante, mais c'est avant tout le degré de sursaturation du liquide en tartrate acide de K à la température considérée qui importe ; il ne dépend pas que de la concentration en potassium auquel on ne peut donc faire jouer un rôle déterminant absolu.

En somme, l'acidité des moûts n'était pas particulièrement basse et, l'on n'avait pas à craindre une forte chute d'acidité sous l'action du froid.

En déduire qu'il n'y avait pas alors à craindre la fermentation malolactique ou qu'il fallait la souhaiter, il n'y avait là qu'un pas qu'il pouvait paraître naturel de faire.

Voulait-on élaborer un vin rosé ? Il fallait penser qu'on lui souhaite d'habitude de la fraicheur, du fruité, une résistance suffisante à l'oxydation.

Etait-ce un vin rouge que l'on voulait faire? il fallait tenir compte de l'influence des matières solides au cours du cuvage, influence qui, si elle se trouvait doublée d'une fermentation malolactique, pourrait aboutir ici, à un résultat désastreux.

Le vin rouge obtenu contient en effet très peu d'acide tartrique et son acidité fixe est relativement faible (3,9 g. en SO_4H_2/l).

Si son acide malique qui constitue l'essentiel de ses constituants acides était attaqué, même remplacé par de l'acide lactique, la boisson deviendrait plate et sans fruité, trop sensible aux oxydations et aux bactéries.

Il serait certes possible de la protéger pour la faire entrer ultérieurement dans des coupages. Il n'en est pas moins vrai qu'elle aurait perdu une partie de ses qualités.

De toutes façons, guider l'évolution du vin en vue d'atteindre un but donné, n'est-ce pas le rôle de l'œnologue? Il faut, pour cela se mettre en mesure de faire des prévisions les plus sûres possibles.

C. — Influence des matières solides.

Reprenons l'exemple de Pin Fourcat 1953 (tableau XXV) qui avait donné lieu à des vinifications en rouge, parallèlement à des fermentations de moûts préalablement séparés des matières solides de la vendange.

Nous voyons, comme on le sait bien, que ces dernières enrichissent le liquide en potasse ; on constate un indice de tartre et une différence « t -p » en valeur algébrique bien plus faibles.

Cela se répercute sur le pH qui est plus élevé que dans les vins rosés et sur l'acidité fixe qui est plus faible, de 0,9 et plus d'un g en SO_4H_2/l, la quantité de tartrate acide de K précipité ayant été nettement accrue.

Il est difficile de prévoir l'acidité des vins rouges qui dépend des quantités d'ions potassium et autres dont il s'est enrichi aux dépens des matières solides de la vendange.

Il n'est pas vain néanmoins, d'espérer arriver à des résultats susceptibles d'aider le vinificateur.

Une expérimentation doit, dans ce but, être entreprise en envisageant les différents cas susceptibles de se présenter, relatifs plus particulièrement au sol, aux fumures, au climat, aux modes de cuvage.

On peut espérer trouver, du point de vue qui nous intéresse ici, une relation entre la composition du moût et celle des matières solides de la vendange qui permette d'évaluer tout au moins l'influence de ces dernières à partir des résultats de l'analyse du moût.

Nous ajouterons même que notre façon d'envisager la question doit mieux permettre qu'auparavant de la clarifier en distinguant la responsabilité des différents facteurs en jeu.

D. — Influence de la fermentation malolactique sur l'insolubilisation du tartrate acide de K.

Quoique, cette fermentation accroissant le pH du milieu, elle doit théoriquement, au-dessous de pH 3,6 environ, diminuer la solubilité du

tartrate acide de K, il était, tous les auteurs n'étant pas, à cet égard, d'accord, utile de s'en assurer et de se rendre compte de l'importance relative de cette modification. On trouvera dans le tableau XXVI les résultats

TABLEAU XXVI

Vins Date de la vinification Conditions de conservation Date de l'analyse	École Cuve C 1957 Chambrage à 2°C depuis le 6/7/59 Mars 1960		École 1958 2 hivers vers 10°C 15/4/59		St-Georges d'Orques Vin de café 1958 2 hivers vers 10°C 20/3/60	
	Témoin	Fermentation malo. faite	Témoin	Fermentation malo. faite	Témoin	Fermentation malo. faite
Degré	9°5	9°5	11,25	11,25	11,65	11,65
pH	2,97	3,2	3,14	3,23	3,2	3,24
Acidités : totale en g...	6,32	4,36	5,0	4,1	4,7	4,04
SO_4H_2/l....	129	91	102	84	96	82
méq/l						
volatile en g.	0,37	0,58	0,46	0,57	0,38	0,39
SO_4H_2/l....	7,5	12	9,5	11,75	7,75	8,00
méq/l						
fixe en gr....	5,92	3,78	4,44	3,45	4,13	3,6
SO_4H_2/l....	121,25	79	90	70,5	84,25	74
méq/l						
Acide tartrique gr/l ...	2,66	1,89	3,13	2,67	2,24	2,02
mmol/l	17,75	12,6	20,9	17,8	14,99	13,5
Potasse gr. bit./l.....	3,04	2,8	3,87	3,58	3,6	3,45
mmol/l	16,15	14,87	20,6	19,1	19,22	18,37
Indice de tartre	1,09	0,84	1,01	0,93	0,78	0,73
t-p.....	1,6	— 2,25	0,26	— 1,31	— 4,23	— 4,87
tp	286,6	187,6	430	340	288	248
s/c à 24° C	610	480	430	390	390	385
à 8°C	133	118	100	92	90	86
à 2°C	81	61				

Liquides prélevés, pour être chambrés, parmi les vins élaborés par M. Cordonnier.

d'analyse de vins ayant, par paire, la même origine : un vin dont une partie avait été conservée de façon favorable à la fermentation malolactique et l'autre de manière à l'empêcher ; même sulfitage des vins mais une des portions dès après la fermentation alcoolique, lors d'un soutirage, l'autre après la fermentation malolactique, celle-ci réalisée en présence des lies. Les uns et les autres ont subi l'action des températures basses de l'hiver, ou bien ont été chambrés à 2°C.

Le vin qui a subi la fermentation malolactique a une plus faible acidité fixe et moins d'acide tartrique et de potasse que le témoin, son pH est de 0,5 à 2 dixièmes d'unité plus élevé.

On remarquera néanmoins que la diminution de potasse due à la fermentation malolactique est toujours plus faible que celle d'acide tartrique ; l'on est par suite amené à se demander si, outre la perte d'acide tartrique par cristallisation un peu plus grande de tartrate acide de K, une partie de cet acide n'aurait pas été estérifiée par les bactéries.

De toutes façons, quoique nous n'ayons pas, au cours de ce travail, étudié l'influence solubilisante éventuelle de l'acide lactique vis-à-vis du tartrate acide de potassium, ces résultats d'analyse ne font pas apparaître cette propriété, à un degré tout au moins suffisant pour compenser les pertes d'acide tartrique, les propriétés solubilisantes de l'acide malique étant, comme nous l'avons vu, nulles ou dans la limite des erreurs possibles.

E. — Méthodes analytiques utilisées.

(cf. JAULMES (5) et RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (34).

Degré alcoolique : Ébullioscope Dujardin Salleron — (la précision n'étant pas ici, à cet égard, utile).

Sucres : Méthode Gabriel Bertrand.

Ammoniac : Déplacement de l'NH_3 par Mg O : titrage en présence de Rouge de Tashiro.

Ca : Précipitation à l'état d'oxalate et dosage oxydimétrique au permanganate de K.

pH : Potentiomètre à électrode de verre (T. S. H. Tacussel).

Acidité totale : Alcalimétrie (phénolphtaléine) (5).

Acidité volatile : Procédé Jaulmes (5).

Acide malique : Méthode Peynaud (34).

Acide tartrique : Méthode Nègre, Dugal et Evesque (24).

Potasse : au photomètre à flamme Schuhknecht.

Chromatographie sur papier des acides organiques : Méthode Pascal Ribéreau-Gayon (34).

VI. — DEGRÉ DE SURSATURATION DES VINS

Ayant calculé les produits de solubilité du tartrate acide de K dans différentes solutions hydro-alcooliques à des températures précisées, nous leur comparons les produits de solubilité de ce même sel acide dans les vins, produits déduits du tp de ces liquides et de la valeur de c au pH considéré (tableau I et de notre publication (24)).

Nous voyons que nos vins, après l'hiver, correspondent à peu près à des solutions hydro-alcooliques saturées vers 18-25°C (tableau XXVII).

Nous remercions MM. J. DULAC et A. BOUAT de la Chaire de Chimie de notre Ecole d'avoir bien voulu nous permettre d'effectuer l'analyse de la potasse avec leur photomètre à flamme.

Les analyses d'acide malique ont été faites par M. et Mme BIZEAU que nous remercions.

C'est aussi ce que l'on constate en étudiant les analyses de vins suffisamment complètes parues dans divers travaux en France et à l'étranger (38 (39) (40) (41) (42).

Si donc les vins peuvent atteindre ou presque, à la longue, l'état d'équilibre à la température à laquelle on les a conservés, ils n'arrivent pas (ceux tout au moins qui ne sont pas soumis à un nombre suffisant d'années de maturation) dans les conditions normales de conservation à l'état d'équilibre correspondant à la température de l'hiver : l'action des froids de cette période qui peut abaisser l'intérieur des caves vers 8 à 10°C dans le Midi n'est pas d'assez longue durée.

Une caractéristique normale des vins est donc de rester plus riches en tartrate acide de K qu'ils ne le seraient s'ils arrivaient à atteindre leur équilibre à la température moyenne qu'ils acquièrent en hiver.

Le traitement par le froid vers —4°C, lorsque le vin n'est conservé que 4 à 6 jours à basse température comme l'on en a l'habitude, est lui-même, semble-t-il, d'effet trés réduit (1). Nous ne parlons ici que de ses répercussions sur l'insolubilisation du tartrate acide de K.

Un traitement intéressant pour régler la souplesse des vins dont le pH est inférieur à 3,6 serait néanmoins de provoquer la cristallisation de leur tartrate acide de potassium jusqu'au but souhaité, l'abaissement du pH qui s'en déduirait limitant ou annulant la variation de résistance des vins vis-à-vis des bactéries qui pourraient en résulter.

On pourrait, par exemple conserver le vin beaucoup plus longtemps à basse température.

La concentration des vins en vue d'une dilution ultérieure, délicate, il est vrai, du point de vue des risques d'oxydation, aboutirait plus rapidement au même résultat, mais le prix de revient de l'opération ne peut être perdu de vue.

Si le degré de concentration est limité et l'addition d'eau au concentré, interdite, la question pourrait être envisagée sous l'angle du mélange de celui-ci avec l'eau de fusion de la glace momentanément séparée, à condition de ne pas la laisser s'altérer.

On pourrait aussi tâcher de lutter contre les forces et les composés qui gênent la cristallisation : par exemple, éliminer les colloïdes protecteurs qui seraient ensuite réintroduits ; cela risquerait cependant de trop modifier en profondeur les caractéristiques des vins.

Nous pensons préférable de passer sous silence les procédés chimiques capables d'agir sur les constituants du tartrate acide de potassium.

(1) Nous remercions M. CADENE de la Cave Coopérative de St-Georges d'Orques de nous avoir fourni des vins et M. COMBACAL qui a bien voulu faire un essai à notre demande à la Cave Coopérative de Montbazin.

Tableau XXVII

	Date de vinification	Date de prélèvement et analyse	d° Sall.	Acidités tot. méq/l	Acidités Fixe méq/l	Acide tartrique mmol/l	Potasse mmol/l	pH	tp	t-p	Indice de tartre	s/c à 24°C	s/c à 8°C	t_n en mmol/l à 8°C	t-t_n sursaturation à 8°C
École — rouge Cave labo.	57	6/59	9,4	124	117	24,12	23,8	3	574,0	0,32	1,01	610	147	12,3	11,8
Cave école — rouge	58	1/7/59	9,5	108	100	20,31	26,13	3,12	428,4	— 5,8	0,75	520	130	8,8	11,5
St-Georges d'Orques rouge	58	1/7/59	10,6	101	93	16,93	24,33	3,22	411,9	— 7,4	0,69	430	102	7,0	9,9
St-Georges d'Orques Café	58	1/7/59	11,6	106	96	17,19	20,82	3,19	357,9	—3,63	0,82	400	91	7,4	9,8
Cave labo.	58		11,35	112	104,8	24,12	22,36	3,05	539,3	1,76	1,07	480	119	11,8	12,3
Cave labo.	58	4/59	11,25	100	90,6	20,87	20,61	3,14	430,1	0,26	1,01	430	100	10,1	10,7
St-Georges d'Orques (Cave labo.)	58		11,75	110	103,8	20,31	22,68	3,05	460,6	—2,37	0,89	460	103	9	11,3
St-Georges d'Orques (Cave labo.)	58	4/59	11,65	97	89,3	17,06	20,82	3,15	355,2	—3,76	0,81	410	94	8,1	8,9
Montbazin (témoin)	58	59	10,5	96,5	87	21	23,6	3,15	495	— 2,6	0,89	460	109	9,2	11,8
Montbazin (traité par le froid)	58	59	10,5	93,5	86	18	20,2	3,15	363	— 2,2	0,89	460	109	9,4	8,6
La Valette — rosé	59	3/60	8,3	130	118	14,4	21	3,05	302,2	— 6,6	0,68	620	162	9,8	4,6
St-Georges d'Orques. Rouge macération 3 jours	59	3/60	9,8	91	81,2	15,5	21,2	3,25	329,3	— 5,7	0,72	450	119	8,4	7,1
St-Georges d'Orques. Café macération 24 heures	59	3/60	10,2	91	81,7	12,9	22,1	3,33	284,4	— 9,2	0,58	400	98	6,3	6,6
Cuve B — rouge	59	3/60	8,75	101	93,7	13,4	24,6	3,3	329,5	—11,3	0,54	450	119	6,6	6,8
Cave École															

Note : Cave labo. = conservé au laboratoire dans la salle non chauffée de stockage des échantillons ; les autres vins étaient conservés dans les caves où ils avaient été élaborés.

VII. — RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Étant donnée l'importance du facteur acidité dans le cadre de la qualité des vins et de leur stabilité, il nous a paru intéressant d'étudier s'il serait possible d'en réaliser la prévision.

Cela permettrait de juger, avec beaucoup plus de sécurité, des moyens à mettre en œuvre pour conduire l'élaboration de ces boissons en vue de leur faire acquérir la composition la plus favorable à l'épanouissement des qualités inscrites dans la matière première.

En partant de la loi d'action de masse, appliquée à l'équilibre entre les molécules de tartrate acide de K, TKH, et les ions TH^- et K^+, nous avons établi une relation qui permet de calculer la teneur en acide tartrique des vins, une fois l'équilibre réalisé à une température donnée n^o C.

Pour faciliter les calculs, et éviter l'insécurité relative à la connaissance imparfaite des pK de l'acide tartrique suivant la température, nous avons construit les courbes donnant, en fonction du pH et du degré alcoolique, les valeurs du terme $\frac{s}{c}$ de notre formule à + 2°, + 8° et + 20°C.

L'influence de la force ionique, l'estérification partielle de l'acide tartrique, sa complexion, son oxydation et le maintien des vins à l'état de solutions sursaturées en équilibre métastable, risquaient de gêner les prévisions.

Divers auteurs avaient en particulier signalé l'influence importante des acides malique et lactique sur la solubilité du tartrate acide de K.

Il convenait de s'assurer que ces facteurs ne perturbaient pas les pronostics.

Nous avons fait les constatations suivantes :

1° En chambrant les vins assez longtemps (4 à 6 mois en général) à la température prévue, ils finissent par atteindre un état d'équilibre stable dans les limites de ce qui nous intéresse actuellement.

2° Nous avons pu, à partir du vin nouveau et à partir du moût même, malgré les modifications résultant des différences de forces ioniques entre les vins et les solutions hydroalcooliques, calculer de façon correcte la teneur en acide tartrique des vins stables et leur acidité fixe aux températures précédemment citées, lorsque le moût mis en fermentation avait été suffisamment sulfité.

L'acide malique ne gêne pas ; s'il a une influence spécifique à cet égard, elle ne peut être que très faible (de l'ordre de la mmol/l).

Il n'en est pas de même en l'absence d'SO_2 et dans le cas de faibles sulfitages, mais pour une autre raison : l'acide malique peut alors être attaqué par les ferments malolactiques, on le sait bien, ou, semble-t-il même, davantage respiré par les levures.

La seule prévision de la teneur en acide tartrique du vin reste alors possible, à condition, bien entendu que des bactéries capables d'attaquer l'acide tartrique ne se multiplient pas.

Ce résultat est de grande importance pour aider à décider s'il est préférable d'empêcher ou de favoriser la fermentation malolactique, donc pour aider à fixer le degré du sulfitage à réaliser dans le cas de vinification, en blanc ou en rosé.

3° Cependant, nous avons constaté par ailleurs, que la vitesse de cristallisation du tartrate acide de K, d'abord rapide, devient très lente. De ce fait, dans la pratique courante, même lorsque les vins se refroidissent jusque vers 8° au cours de l'hiver, leurs teneurs en acide tartrique et potasse sont, après cette période, comparables à celles de solutions hydroalcooliques de même degré, saturées en tartrate acide de K à 20-25°C, de telle sorte qu'il est préférable d'avoir recours, pour les calculs, à la courbe $\frac{s}{c}$ correspondant à une température de cet ordre. Cette vitesse de cristallisation varie d'ailleurs avec les vins, d'où une certaine indétermination.

Lorsqu'on traite les vins par le froid, ils sont aussi loin d'atteindre leur état d'équilibre à la température considérée parce que leur durée de chambrage à basse température (4 à 5 jours généralement) est beaucoup trop courte. La prévision de l'acidité finale du vin ne peut être précise de ce fait et d'ailleurs pas davantage dans le cas du froid naturel, la rigueur de l'hiver n'étant pas prévisible.

En vinification en rouge, il convient de penser de plus à l'influence, d'intensité plus difficilement prévisible, des matières solides ; on peut cependant espérer trouver, du point de vue qui nous intéresse ici, une relation entre la composition du moût et celle des matières solides de la vendange qui permette d'évaluer tout au moins l'influence de ces dernières à partir des résultats de l'analyse des moûts.

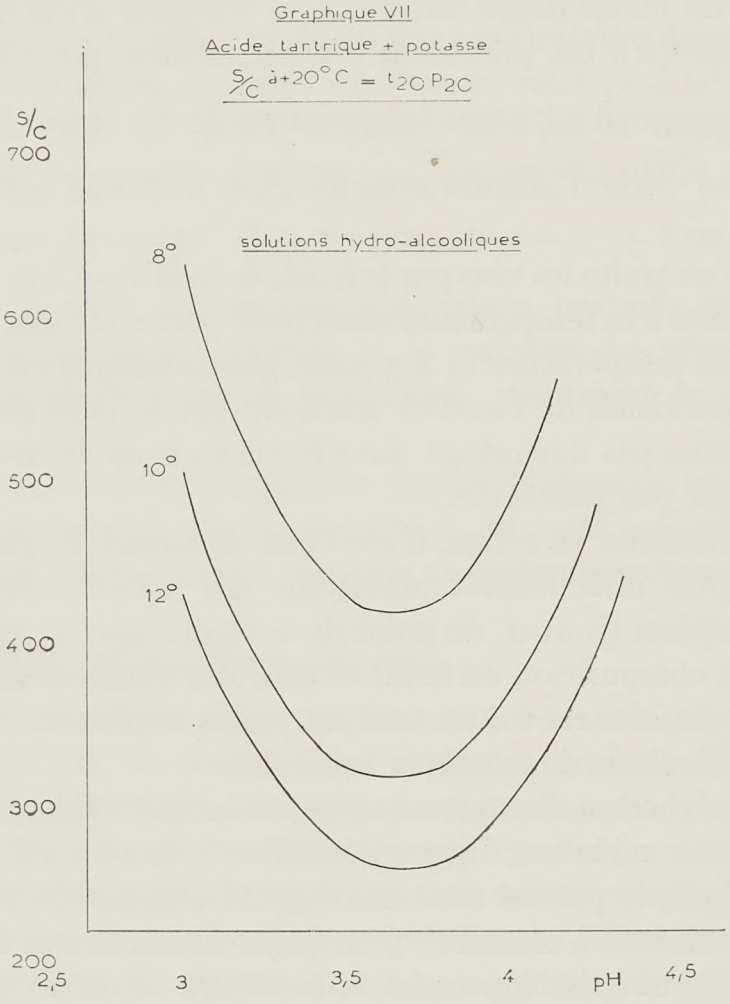
Notre méthode a, de toutes façons, un intérêt évident : la teneur calculée du vin en acide tartrique à l'équilibre à 20 ou 24°C par exemple et l'acidité théorique prévue sont des caractéristiques du moût particulièrement importantes à connaître pour juger de son avenir dans le cadre de la vinification, et aider à préciser la meilleure façon de guider son évolution.

Si l'on ne peut envisager de les déterminer pour chaque moût, il serait possible de le faire dans le cas des différents types représentatifs régionaux de moûts de l'année, ce qui fournirait aux œnologues conseils et aux vinificateurs des bases sérieuses pour préciser le mode de vinification à conseiller ou à réaliser.

Il sera cependant préférable de trouver une méthode d'analyse plus rapide des acides tartrique et malique.

Cette étude, ayant été faite sur des quantités relativement faibles de moût, placées donc dans des conditions différentes de la pratique courante, elle reste cependant à vérifier dans le cadre de cette dernière, en envisageant la possibilité d'une modification éventuelle, en particulier, du pourcentage admis de l'acide malique consommé par la levure.

Outre l'intérêt d'évaluer l'avantage des corrections de l'acidité par voies chimiques et biochimiques, notre méthode donne enfin à l'Œnologue des bases scientifiques incontestables pour choisir les moûts et les vins dont la composition est la plus convenable à l'élaboration de concentrés et éventuellement même aider le législateur à décider s'il est, une année de faible degré, préférable d'abaisser momentanément le degré alcoolique minimum des vins.



Reçu pour publication le 30 mars 1960.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) CHANCEL. — *Jour. Pharm. et Chimie* (4), **1**, p. 348, d'après (1') p. 23 et (4') p. 116.

(1') VENTRE (J.). — Traité de vinification, **1**, p. 24. Librairie Coulet-Dubois et Poulain, Montpellier.

(2) KISSEL. — *Zeitsch. für Analyt. Chem.*, **8**, p. 409, d'après Wurtz, t. III, p. 221, 1878.
(3) ROELOFSEN. — *American Chemical Journal*, **16**, p. 464 à 467, 1894.
(3') BENVEGNIN, CAPT et PIGUET. — Traité de vinification, p. 524, Payot, Lausanne, 1947.
(4) BERTHELOT et DE FLEURIEU (A.). — *Ann. Chimie et Phys.* (4), **5**, p. 177, 1865.
(4') RIBEREAU-GAYON (J.). — Traité d'Œnologie. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris et Liège, 1947.
(5) JAULMES (P.). — Analyse des vins. Éditeur Poulain, Montpellier, 1951.
(6) PAUL. — Das chemische Gleichgewicht zwischen Weinsäure und Dikaliumtartrat als Grundlage der Entsäuerung des Weines mit diesem Salz. *Z. für Elektrochemie*, **23**, 65, 1917. Die Entsäuerung des Weines mit Kohlensäurem Kalk. *Z. für Elektrochemie*, **21**, 542, 1915.
(7) BOHNEN (E.). — Das chemische Gleichgewicht von Weinsäure und Milksäure mit Dikaliumtartrat. Dissertation Munich, 1919.
(8) VENTRE (J.) et BOUFFARD (E.). — La potasse et les vins anormaux de 1921. *Ann. Falsif. Fraud.*, nº 159, février, mars 1922.
(9) VENTRE (J.). — Quelques considérations sur les vins de la récolte 1932. *Ann. Ecole Nat. Agri. Montpellier*, **22**, fasc. III, p. 203, 1933.
(9') VENTRE (J.). — Sur l'acidification de la vendange et des moûts. *Ann. Ecole Nat. Agri. Montpellier*, **23**, Fasc. III, p. 127, 1934.
(10) FONZES-DIACON. — Les vins anormaux de 1921. *C. R. Ac. Agri.*, p. 405, 29 mars 1922. — L'acide tartrique et les vins anormaux de 1921. *C. R. Ac. Agric. Fr.*, p. 558, 24 mai 1922.
(11) BRÉMOND (E.). — Contribution à l'étude analytique et physico-chimique de l'acidité des vins. Thèse Alger, 1937.
(11') BRÉMOND (E.). — Le froid en œnologie. *Rappri au Xe Congrès Int. des Ind. Agr.* Madrid 1954.
(12) TOMASSET (Luciano Usseglio). — Contributo alla conoscenza degli equilibri fisico-chimici in funzione della stabilizzazione dei vini. *Ac. Ital. della vite e del vino*. Siena. Atti. Vol. VI, p. 335, 1954.
(13) MATHIEU (L.) et CHAUVET (P.). — Sur la solubilité de la crème de tartre dans les vins. *Bull. de l'Ass. des Chimistes de sucrerie*. **30**, p. 845, 1912, 1913.
(14) GENEVOIS (L.). — La solubilité des tartrates de potassium et de calcium dans les solutions alcooliques acides, les moûts et les vins. *Ann. Brass. et Dist.*, p. 310, 1934.
(15) BOUFFARD (A.). — De l'acidification de la vendange et du vin. *Congrès d'Œnologie de Toulon*, 1908.
(16) FERRE. — Chimie et Industrie, 4e Congrès, p. 582, 1925.
(17) FONZES-DIACON. — Les vins anormaux, leur distinction des vins mouillés, indice de tartre. *Ann. Fals. Fraudes*, **203**, p. 532-604, 1925. — L'indice de tartre dans les vins de marcs rouge et blanc. *Ann. Fals. Fraud.*, 223-224, p. 467-471, 1927. — Encore les vins anormaux. *Ann. Fals. Fraud.*, **229**, p. 17-18, 1928. — L'excès de potasse dans les vins en 1921. *C. R. Ac. Agri.*, p. 809, 30 novembre 1921. — L'acide tartrique libre dans les vins de 1922. *C. R. Ac. Agri.*, p. 865, 15 novembre 1922.
(18) SLIZEWICZ. — Étude sur le mouillage des vins. Thèse doct. pharmacie. Montpellier 1938.
(18') JAULMES (P.) et SLIZEWICZ. — *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **1**, p. 29, 1942, et *Bull. Soc. Chim.*, p. 59, 1943.
(19) FLANZY (M.). — L'indice de tartre dans les vins. Signification météorologique. B. O. I. V. nº 195, p. 13, mai 1947.
(20) PEYNAUD (E.). — Métabolisme des acides organiques au cours de la maturation du raisin. *Ind. Agr. Alim.*, p. 167, avril, juin, 1947
(21) GENEVOIS (L.) et RIBEREAU-GAYON (J.). — Le vin, 1947.

(22) BERG (H. W.) et KEEFER (R. M.). — Analytical Détermination of tartrate stability in Wine. *I Potassium Bitartrate Wines a. Vines*, vol V, n° 2, p. 180, octobre, décembre 1958.

(23) NÈGRE (E.). — Les pH remarquables des moûts et des vins. *Ac. Agri. France*. Séance du 16 décembre 1953.

(24) NÈGRE (E.), DUGAL (A.) et EVESQUE (J. M.). — Dosage de l'acide tartrique sous forme de tartrate acide de potassium dans les moûts et les vins. *Ann. de Techn.*, 7e année, **1**, p. 31, 1958.

(25) NÉGRE (E.). — Les facteurs de solubilité de l'acide tartrique en présence de potassium. *Comm. Ac. Agri. France*, 1er décembre 1954.

(26) DUTOIT (P.) et DUBOUX (M.). — L'analyse des vins par volumétrie physico-chimique. Lausanne. F. Rouge et Cie Edit. Librairie de l'Université, 1912.

(27) ALLUARD. — De la solubilité des sels. *C. R. Ac. Sc.*, t **59**, p. 500 et d'après WURTZ, **3**, p. 221.

(27') WURTZ. — *Dict.*, **3**, p. 221, 1856.

(28) SEIDELL ATHERTON. — Solub. of inorganic and organic componds. 2e Edit., p. 1377, 1927.

(29) KISSEL. — *Zeit für Analyt. Chem.*, **8**, p. 409 et d'après WURTZ, **3**, p. 221, 1878.

(30) SEMICHON, FLANZY (M.) et LAMAZOU-BETBEDER (Mlle). — Dosage de la potasse et des alcalis dans les moûts et les vins. *Ann. Fals. Fr.*, **263**, p. 517, 1930.

(31) JAULMES (P.) et HAMELLE (Mlle). — Concentration des vins par le froid. *Ann. Techn.*, III, p. 243, 1954.

(32) DAMANSKI (A. F.), ARSENIJEVIC (V. C.) et ARSENIJEVIC (L. S. Mme). — *C. R. Ac. Sc.* (CCXLIII), n° 13, p. 919-920, 24 sept., 1956.

(33) PEYNAUD (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation des raisins et de la composition des vins. Thèse Bordeaux, 1946.

(34) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — Analyse et Contrôle des vins. Libr. Polyt. Béranger, Paris.

(35) CARLES, LAMAZOU-BETBEDER (Melle) et PECH (Mme R.). — Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin? *C. R. Ac. Sc.*, 9 avril 1958.

(36) DEIBNER (L.). — œnométrie, son état actuel, son rôle dans la prévision de certains phénomènes œnologiques. *Rev. des Ferment. Indust. Alimen.*, **9**, n° 4, p. 158 à 172, **9**, n° 5, p. 198 à 210, 1954. œnométrie. Quelques faits complémentaires. *Rev. des Ferment. Industr. Alimen.*, . **10**, n° 3, p. 125 à 131, 1955.

Dans ces publications sont cités en particulier les travaux de :

MOURSAÈVA (A.) et BRAILOVSKAYA (A.). — Cristallisation du tartre dans le jus de raisin. *Vinodélié i Vino gradarstvo*, SSSR, n° 3, 12, 21, 1952.

FROLOV-BAGREEV (A.) et AGABALIANTZ (G.). — Chimie du vin, SS, Moscou. Pischempromizdat. 1951.

MICHOD (J.). — Résultats de recherches récentes sur la gravelle. *Rev. Romande Agric. Vitic.* et *Arboric.* juin 1952.

JAULMES (G.). — p. 240 (5).

PONOMAREV (V.). — Méthode de la détermination de l'aptitude des vins mousseux à la mise en bouteilles. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, n° 9, 12, 20, 1952.

NÈGRE (E.). — (25).

(37) GENTILINI. — L'indice de bitartrate et sa validité. *Rev. de Vitic. et d'Œnologie*. Conegliano. Extrait du n° 9. Septembre 1958.

(38) PEYNAUD (E.). —Analyses complètes de huit vins doux naturels. Extrait *Ann. Agro.* n° 3, 1950. Analyses complètes de douze vins de Bordeaux. Extrait *Ann. Agro.* n° 2, 1950.

(39) GEORGEAKOPOULOS (G.). — Travaux récents de l'Institut du Vin sur les moûts et les vins Grecs. Athènes, 1957.
(40) BRÉMOND (E.). — cf. (11).
(41) CARRION Y CARRION (P.) et GARCIA VIANA (E.). — Composition des vins de la marque Requena Utiel. *Bull. Inst. Nat. des Recherches Agro.* Madrid, nº 35, p. 297, décembre 1956.
(42) Laboratoire Municipal et Régional de Nîmes. Enquête sur la constitution de quelques vins du Gard de la récolte 1953. *Ann. Falsif. fr.*, p. 9, 1955.
(43) MICHOD (J.). — Nouvelles expériences sur la désacidification chimique des moûts et des vins blancs. *Revue Romande d'Agri., de Viti. et d'Arbori.* p. 55, juillet 1958.
Le problème de la désacidification chimique en vinification. Extrait du rapport d'activité des Stations fédérales d'essais agricoles. Lausanne. *Annuaire Agri.* Suisse, 59, p. 491-502, 1958.
(44) NÈGRE (E.). — Concentration des vins par le froid ou abaissement du degré minimum légal? *Progrès Agricole et Viticole*, **2**, p. 378, 1953, **1**, p. 7, 1954.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 18-10-1960.

Dépôt légal : 4e trimestre 1960. *N° d'impression 140.*

ÉTUDE SUR LA VARIATION DE LA TENEUR EN NH_4, K, Ca, Mg DE QUELQUES RAISINS AU COURS DE LA MATURATION

PAR

A. PUISSANT

Station de Recherches viticoles, œnologiques et d'Arboriculture fruitière, Angers,
avec la collaboration technique de
J. HERVÉ et **M. GENTY**

L'auteur se propose de suivre l'évolution des cations NH_3^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++} dans le raisin au cours de la période de véraison-maturité.

Les travaux correspondants commencés en 1954 ont été poursuivis et complétés en 1955. Leur publication a été retardée jusqu'en 1960. Ils restent valables.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Préparation des échantillons et méthodes de dosages.

III. — Résultats analytiques.

IV. — Conclusion.

V. — Bibliographie.

I. — Introduction.

Dans le moût de raisin les acides organiques et minéraux sont selon leur degré de dissociation entièrement ou partiellement salifiés par des bases dont les plus abondantes sont le potassium, le magnésium, le calcium et l'ammonium. Au cours de la vinification, une partie de ces bases

s'élimine en entraînant une certaine proportion de corps acides. L'autre partie demeure dans le vin à l'état de sels. Pour nous permettre de mieux apprécier la constitution des vins récoltés dans la région bordant le cours inférieur de la Loire, nous avons envisagé d'effectuer le dosage de ces bases et de suivre leur évolution dans le raisin, au cours de la période allant de la véraison à la maturité.

II. — Préparation des échantillons et méthodes de dosage

Les prélèvements ont porté sur six cépages cultivés dans diverses communes de la région. Afin d'avoir un volume de jus suffisant et afin également de suivre l'évolution des acides organiques nous avons adopté la technique de prélèvement décrite par PEYNAUD dans son étude sur la maturation des raisins de la région de Bordeaux (1). Nous avons suivi un procédé semblable pour l'extraction des moûts destinés à l'analyse.

L'ion ammonium a été dosé selon la méthode de Boussingault par entraînement à la vapeur d'eau, l'appareil utilisé étant celui de JAULMES (2).

Avant de doser les autres éléments, potassium, calcium, magnésium nous avons dû procéder à la minéralisation sulfonitrique dans un minéralisateur. Le potassium a été précipité à l'état de cobaltinitrite de potassium et de sodium dont les groupements nitreux ont été réduits en azote ammoniacal. Nous avons adapté le procédé utilisé par MAUME et ses collaborateurs (3) aux doses de potassium contenues dans 10 cc de moût. Le calcium a été dosé par oxydation cérimétrique de l'oxalate précipité en présence de glycérol, selon les indications de Cl. DUVAL (4). Pour doser le magnésium nous avons eu recours à la technique de JAVILLIER et LAVOLLAY (5).

Tous ces dosages ont été conduits en série. D'après les contrôles effectués nous reconnaissons que les résultats obtenus peuvent être entachés d'une erreur maximale plus ou moins de 10 p. 100.

III. — Résultats analytiques.

Etant donné les moyens dont nous disposons nous n'avons pu effectuer en 1954-55 que les dosages du potassium et de l'ammonium. Au cours de la saison suivante nos investigations ont porté en outre sur le calcium et le magnésium.

Les résultats sont exprimés en milliéquivalents par litre de moût dans le tableau II. Le tableau I établit la correspondance entre les numéros et les dates de prélèvements. A ces résultats analytiques nous avons joint les données météorologiques relevées au poste de Belle Beille, tableau III.

TABLEAU I

Date des prélèvements.

Cépage et lieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Année 1954									
CHENIN : B. Beille	9/9	21/9	30/9	11/10	1° dép.	2° dép			
CHENIN : Rochefort ..	9/9	21/9	30/9	11/10	11/10 [1]				
CHENIN : Beaulieu ..	9/9	21/9	30/9	11/10	11/10 [1]				
CABERNET : Tigné ..	9/9	21/9	30/9	11/10	18/10	28/10 [2]			
CABERNET : Rochefort	31/8	9/9	21/9	30/9	11/10	18/10	28/10		
GROSLOT : Beaulieu .	31/8	9/9	21/9	30/9	11/10	18/10			
GROSLOT : Brissac ...	31/8	9/9	30/9	11/10					
MUSCADET	30/8	8/9	20/9	7/10	7/10 [1]				
Année 1955									
CHENIN : B. Beille ..	18/8	25/8	1/9	8/9	21/9 [1]	6/10	18/10	18/10 [1]	vend.
CHENIN : Beaulieu ..	18/8	25/8	1/9	8/9	21/9	5/10	5/10 [1]	17/10	17/10 [1]
CABERNET : Tigné ...	25/8	1/9	8/9	21/9	5/10	17/10			
CABERNET : Rochefort	11/8	18/8	25/8	1/9	8/9	21/9	5/10		
GROSLOT : Beaulieu ..	11/8	18/8	25/8	1/9	8/9	21/9			
MUSCADET	10/8	17/8	24/8	31/8	7/9	19/9			
CHARDONNAY.....	11/8	18/8	25/8	1/9	8/9	21/9	29/9		
SAUVIGNON	18/8	25/8	1/9	8/9	21/9	5/10	5/10 [1]		

[1] Moût de raisins pourris.
[2] Ce moût de Tigné 1954 a été extrait de raisins dont une partie était pourrie.

TABLEAU II

Variations du K et du NH_4 au cours de la maturation en 1954
Résultats exprimés en milliéquivalents par litre de moût

N° du prélèvement	1	2	3	4	5	6	7
CHENIN : Belle-Beille							
K	24,9	25,4	21,6	21,2	27,7	31,2	
NH_4	16	14,65	13,45	11,2	8,3	8,65	
CHENIN : Rochefort							
K	32,9	33,7	31,1	29,5	37,2 [1]		
NH_4	7,25	6	4,9	4,15	2,5 [1]		
CHENIN : Beaulieu							
K	23,6	24,8	24,1	26	39,9 [1]		
NH_4	7,8	5,85	4,25	4,25	2,6 [1]		
CABERNET : Tigné							
K	35,5	38,6	35,3	37,85	32	45,6 [2]	
NH_4	4,95	4,45	4,3	4,35	3,2	2,9 [2]	
CABERNET : Rochefort							
K	31,05	35	30,3	25,2	32,6	28,6	23,8
NH_4	4,7	4,05	2,35	2,2	1,7	2,3	1,8
GROSLOT : Beaulieu							
K	24,5	24,7	23,4	26,6	30	34,7	
NH_4	17,7	7,95	5,45	6,2	5,85	6,20	
GROSLOT : Brissac							
K	28,45	25,1	28,5	29,5	29,1		
NH_4	15,8	12	11,7	10,8	10,55		
MUSCADET :							
K	31,9	24,7	20,4	21,9	26,35	53 [2]	
NH_4	16,6	11,65	8,7	7,75	6,2		

[1] Raisins pourris.
[2] Contient un peu de raisins pourris.

TABLEAU II *(Suite)*

Variations de K — Ca — Mg — NH_4 dans les moûts au cours de la maturation en 1955 Résultats exprimés en milliéquivalents par litre de moût.

N° du prélèvement	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CHENIN : Belle-Beille									
K	27,35	30,5	27,15	25,25	23,35	22,2	24,55	49,45 [1]	29,4
Ca	8	6,5	5,9	5,8	4,6	4	3,5	4,5 [1]	4,5
Mg	7,4	6,2	5,5	5,3	5,3	4,6	5,3	9,6 [1]	5,3
NH_4	20,4	16,35	15,4	11,9	8,15	7,4	2,65	5 [1]	5,9
CHENIN : Beaulieu									
K	34,2	38	31,45	31,75	30,65	31,1	60,3 [1]	34,9	54,15 [1]
Ca	7,9	8	5	5	3,9	4	7,9 [1]	4,2	5,4 [1]
Mg	8	8	6,5	6,2	6,1	5,9	13,8 [1]	7,1	9,7 [1]
NH_4	10,7	8,6	7,2	5,45	3,55	2,55	1,25 [1]	3,33	4 [1]
CABERNET : Tigné									
K	42,75	41,05	39,7	41,3	46,25	40,3			
Ca	10	7,6	6,1	5,6	3,8	4,3			
Mg	7,4	6,7	6,1	5,6	5,9	5,9			
NH_4	6,35	3,9	6,05	1,35	1,04	2,13			
CABERNET : Rochefort									
K	35,9	39,7	42,55	41,45	41,2	42,3	42,7		
Ca	10,7	9,3	6,3	4,8	4,5	4,4	4		
Mg	10,2	10	7,8	7,5	6,6	8	7,6		
NH_4	2,7	2,2	2,8	1,25	1,08	0,13	0,14		
GROSLOT Beaulieu									
K	33,35	32,85	38,3	32,2	32,2	34,2			
Ca	7,6	5,9	4,8	3,6	4,1	3,45			
Mg	7	6,7	5,3	4,9	4,9	5			
NH_4	14,1	12,1	8,7	6,2	5,2	3			
MUSCADET									
K	42,4	45,85	42,80	37,45	34,5	34,15			
Ca	9,9	8,3	6	5,1	5	4,3			
Mg	8,9	7,8	6,7	6,3	6,2	6,6			
NH_4	18,3	13,4	9	7,85	6,8	5,7			
CHARDONNAY									
K	50,7	41,45	40,4	54,8	52,75	55,1	47,55		
Ca	21,2	11,7	9,2	8,2	7,6	8,6	7,5		
Mg	10,7	8,6	7,6	7,7	8,3	8	8,1		
NH_4	17,1	12,4	10,85	8,25	7,3	6,2	7,15		
SAUVIGNON									
K	42,9	35,65	38,7	41,1	36,95	38,05	64,6 [1]		
Ca	10,4	6,5	5,4	3,7	4,5	4,1	8,1 [1]		
Mg	10,4	7,5	6,8	6,7	6,4	6,3	13,7 [1]		
NH_4	9,5	5,35	4,5	5,5	2,65	1,95	2,3 [1]		

[1] Moût provenant de raisins pourris.

Nous avons noté qu'en 1954 la production fut de qualité moyenne. L'indice moyen de maturité du Chenin relevé à la station n'avait atteint que 21,05 alors qu'en 1955 il était de 40,5. L'année 1954 avait été caractérisée par une somme de températures moyennes faible, une luminosité peu intense et une pluviométrie élevée surtout du mois d'août au mois de novembre. Voici les résultats pour chacun des éléments étudiés.

Tableau III

Caractéristiques météorologiques

	I	II	III	IV	V	VI
			Année 1954			
Avril	110,521	276,4	177,2	111,8	175	4
Mai	1.274,913	681,4	357	217,9	417	16
Juin	3.416,258	1.145,35	520,8	294,	1.021	26
Juillet	5.976,284	1.652,50	704,4	397,7	1.253	36
29 août	8.518,977	2.150,15	827,9	457,7	2.238	53
30 août	8.611,620	2.168,10	837,5	460,2	2.238	53
7 sept.	9.438,977	2.318,85	880,7	475,6	2.280	57
8 sept.	9.504,728	2.334,90	883,1	477,8	2.280	57
19 sept.	11.100,225	2.503,90	908,2	493,4	2.513	65
20 sept..	10.128,871	2.517,25	909,8	494,4	2.528	66
29 sept.	10.454,547	2.638,35	936,7	509,5	2.752	71
6 oct.	10.752,728	2.741,65	958,4	520,6	2.756	73
10 oct.	10.779,383	2.786,40	968,7	525,2	2.783	75
17 oct.	11.020,347	2.886,30	996,2	553,4	2.821	76
27 oct.	11.314,822	3.019,50	1.012	547,8	3.055	81
			Année 1955			
Avril	468,32	336,65	186,3	82,1	0	
Mai	1.520,77	731,15	389,6	185,6	444	13
Juin	4.204,86	1.229,40	588,6	268,9	2.020	24
Juillet	8.717,642	1.862,50	851,5	395,9	2.395	29
9 août	9.688,09	2.027,80	935,7	436,2	2.395	29
10 août	9.765,076	2.044,15	936,9	437,8	2.417	30
16 août	10.442,007	2.157,6	987,2	459,5	2.452	31
17 août	10.592,811	2.179,25	996,6	463,6	2.452	31
23 août	11.674,414	2.322,65	1.066	496,3	2.452	31
24 août	11.857,069	2.347,15	1.077,6	504,2	2.452	31
30 août	12.672,166	2.473,9	1.131,3	533,1	2.452	31
31 août	12.809,053	2.495,2	1.136,6	535,7	2.467	32
6 sept.	13.459,433	2.610,55	1.167	543,7	2.479	34
7 sept.	13.546,215	2.628,20	1.173,6	557,3	2.479	34
18 sept.	14.204,657	2.801,75	1.229	589,4	2.550	38
20 sept.	14.368,239	2.837,15	1.246,8	596,2	2.550	38
28 sept.	14.976,849	2.976,15	1.284,8	617,4	2.592	39
4 oct.	15.161,234	3.058,45	1.310,5	632	2.592	40
5 oct.	15.198,955	3.072,80	1.315,3	634,9	2.602	41
16 oct.	15.466,856	3.218,15	1.342,8	651,6	2.745	44
17 oct.	15.475,721	3.230	1.343,8	652,9	2.745	44

I. — Somme des degrés héliothermiques = Durée du jour à Paris × (Température moyenne sous abri — 11°) 11° = 0 végétatif.
II. — Sommes des températures moyennes sous abri.
III. — Sommes des degrés actinométriques (actinomètre à boule blanche).
IV. — Sommes des degrés évaporométriques (évaporomètre Piche) depuis le 1er avril.
V. — Sommes des hauteurs de pluie en 1/10 de millimètre.
VI. — Sommes des jours de pluies.

L'ammonium.

Au cours de la maturation du raisin, la teneur des moûts en ammonium diminue d'abord rapidement, puis tend vers une valeur inférieure qui est atteinte au voisinage de la maturité. Ces résultats correspondent à ceux trouvés par Peynaud (6-7). Parfois au moment de la récolte, elle manifeste une légère tendance à augmenter. Cependant dans les moûts provenant de raisins envahis par le Botrytis, l'ammoniaque marque sou-

vent un fléchissement par rapport aux teneurs trouvées dans les jus extraits de grains sains. Cette diminution peut être masquée par la concentration produite par la pourriture ou par le mauvais choix de l'élément de comparaison.

En 1954, année où le raisin n'avait pas atteint une maturité satisfaisante, les moûts provenant des derniers prélèvements effectués avant les vendanges avaient des teneurs en ammonium plus élevées que celles correspondantes de l'année 1955. Dans d'autres années, où les conditions météorologiques étaient également défavorables, par exemple 1951 et 1956, nous avons aussi trouvé beaucoup d'ammonium dans les moûts provenant des derniers échantillons récoltés. Il semble donc qu'il existe une relation entre les doses élevées d'ammonium et les conditions météorologiques des mauvaises années.

Parmi les moûts des divers cépages examinés ceux qui proviennent du Cabernet franc sont comparativement moins riches que les autres. Ceci a été constaté non seulement pour les années 1954 et 1955 mais également pour des années antérieures.

Le Calcium.

D'après les résultats relevés en 1955, cet élément est devenu de moins en moins abondant dans les moûts au fur et à mesure de l'approche de la maturité. Sa teneur diminue environ de moitié entre la véraison et la maturité.

Comparée aux quantités de calcium soluble, dans des solutions aqueuses contenant soit 53,2, soit 106,4 milliéquivalents d'acide tartrique par litre, la teneur des moûts de raisins sains récoltés juste avant les vendanges parait faible. D'après Genevois (8) qui rapporte les travaux de Th. Paul, on trouve dans ces solutions aqueuses 11,6 et 15,1 milliéquivalents de calcium. Dans la presque totalité des cépages étudiés, nous n'avons pas trouvé plus de cinq milliéquivalents. Seul le Pinot Chardonnay fait exception avec 7,5, mais il s'agit là du cas particulier d'une jeune plante de quatre ans n'ayant produit qu'une faible quantité de raisins. Comparativement aux résultats trouvés par Françot et Geoffroy (9) sur un moût de Pinot noir d'Ay de 1944 (9 à 12,6 milliéquivalents de calcium par litre selon le stade de la pressée) les moûts que nous avons analysés se révèlent plus pauvres en calcium. Les chiffres que nous avons trouvés se rapprochent de ceux de Lasseyre pour les moûts de cépages blancs de la Gironde.

A la suite de la concentration due à la pourriture le calcium augmente dans les moûts. Malgré cela, il n'y a pas eu d'après nos chiffres de moûts de raisins pourris ayant une teneur en calcium supérieure à 9 milliéquivalents.

D'après le travail de LASSEYRE les vins rouges de Bordeaux seraient moins riches en calcium que les vins blancs. La comparaison des moûts de raisins sains provenant de cépages blancs et rouges ne fait pas apparaitre de différence notable. Seule la surmaturation vient modifier cette égalité.

LE MAGNÉSIUM.

Comme celle du calcium, la teneur en magnésium des moûts diminue de la véraison à la maturité. Au voisinage de la maturité on trouve environ les 2/3 du magnésium qui existait lors du premier prélèvement. Cependant, le magnésium diminue moins que le calcium. Alors qu'au premier prélèvement, on trouve autant de calcium que de magnésium ou davantage de calcium, à l'époque des vendanges il y a toujours plus de magnésium que de calcium.

LE POTASSIUM.

Le potassium est quantitativement l'élément minéral le plus important du moût. C'est aussi celui qui au cours des années 1954 et 1956 présente le plus de stabilité. Les grains de raisin sont alimentés régulièrement par la plante en cet élément pendant la maturation. Cet apport compense l'effet de la dilution. C'est ainsi que le potassium de 1000 grains de Chenin de Beaulieu est passé en 1955 de 16,55 à à 20,35 puis à 25,81 et enfin à 30,05 milliéquivalents. Dans les moûts en provenance de raisins pourris ,sa teneur augmente et atteint presque le double de celle trouvée dans les raisins sains.

En comparant les résultats des tableaux II et les conditions météorologiques propres à chacune des deux années, il apparaît que la période pluvieuse qui a précédé les vendanges de 1954 a nui à l'accumulation du potassium dans le grain. Les moûts sont en effet moins riches d'un quart ou d'un cinquième que ceux de 1955. Dans deux études, l'une sur le potassium et les vins de l'Aude de 1943 (11), et l'autre sur la signification météorique de l'indice des tartres (12), FLANZY avait déjà montré que l'importance des pluies pendant la période précédant les vendanges n'était pas en rapport avec la richesse des moûts en potassium. La réduction des teneurs en potassium relevée en 1954 peut selon FRANC de FERRIÈRES (13) résulter d'un lessivage trop rapide des électrolytes permettant l'échange du potassium du sol, lessivage qui se produit en période fortement pluvieuse dans les sols acides ou faiblement calcaires.

RAPPORT ENTRE LES DIVERS ÉLÉMENTS

Les rapports entre les divers éléments sont inscrits dans le tableau IV.

a) *Rapport* K/NH_4 : Ce rapport s'élève pendant la période qui va de la véraison à la maturité et s'élève encore au cours de la surmaturation.

Tableau IV

Rapports existant entre les éléments minéraux étudiés

N° du prélèvement	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Chenin : Belle-Beille									
Mg/Ca	0,925	0,954	0,949	0,914	1,152	1,250	1,514 [1]	2,133 [1]	1,17
K/Mg	3,696	4,919	4,945	4,764	4,405	4,826	4,632	5,151 [1]	5,547
K/Ca	3,418	4,692	4,602	4,353	5,076	5,550	7,014	10,988 [1]	6,533
K/NH_4	1,34	1,865	1,76	2,12	2,86	3	2,83	9,89 [1]	4,98
Chenin : Beaulieu									
Mg/Ca	1,013	1	1,900	1,240	1,564	1,475	1,747 [1]	1,690	1,796 [1]
K/Mg	4,275	4,750	4,838	5,120	5,024	5,271	4,369 [1]	4,915	5,582 [1]
K/Ca.	4,329	4,750	6,290	6,350	7,859	7,775	7,632 [1]	8,309	10,027 [1]
K/NH_4	3,20	4,41	4,37	5,82	8,63	12,20	48,24 [1]	10,48	13,53 [1]
Cabernet : Tigné									
Mg/Ca	0,740	0,881	1	1	1,638	1,372			
K/Mg	5,777	6,127	6,508	7,375	7,838	6,830			
K/Ca	4,275	5,401	6,508	7,375	12,569	9,372			
K/NH_4	6,73	10,52	6,56	30,59	44,47	18,92			
Cabernet : Rochefort									
Mg/Ca	0,962	1,075	1,238	1,562	1,466	1,818	1,9		
K/Mg	3,519	3,970	5,455	5,526	6,242	5,287	5,618		
K/Ca	3,355	4,266	6,753	8,635	9,155	9,613	10,675		
K/NH_4	13,3	18,04	15,19	33,16	38,14	32,53	30,5		
Groslot : Beaulieu									
Mg/Ca	0,921	1,135	1,104	1,361	1,195	1,449			
K/Mg	4,764	4,902	7,226	6,571	6,571	6,840			
K/Ca	4,388	5,567	7,979	8,944	7,853	9,913			
K/NH_4	2,36	2,71	4,40	5,19	6,18	11,40			
Muscadet									
Mg/Ca	0,898	0,939	1,116	1,235	1,240	1,534			
K/Mg	4,764	5,877	6,388	5,944	5,564	5,174			
K/Ca	4,282	5,524	7,133	7,343	6,900	7,941			
K/NH_4	2,31	3,42	4,75	4,77	5,07	6,44			
Chardonnay									
Mg/Ca	0,504	0,735	0,826	0,939	0,965	1,052	1,080		
K/Mg	4,738	4,819	5,307	7,116	6,355	6,887	5,870		
K/Ca	2,391	3,542	4,391	6,683	6,133	7,250	6,340		
K/NH_4	2,96	3,35	3,72	6,64	7,22	8,88	6,65		
Sauvignon									
Mg/Ca	1	1,153	1,259	1,810	1,422	1,536	1,691 [1]		
K/Mg	4,125	4,753	5,691	6,134	5,773	6,039	4,715 [1]		
K/Ca	4,125	5,484	7,166	11,108	8,211	9,280	7,975 [1]		
K/NH_4	4,51	6,66	8,6	7,47	13,94	19,51	28,08 [1]		

[1] Moût de raisins pourris.

Son augmentation a été plus importante en 1955 qu'en 1954. Ceci résulte du comportement différent de l'ammonium au cours de ces deux années.

b) *Rapport Mg/Ca* : Il augmente au cours de la maturation et de la surmaturation. Dans les derniers moûts récoltés il atteint des valeurs comprises entre 1 et 2. La moyenne est d'environ 1,5. Dans les moûts de raisins envahis par la pourriture il est plus élevé que celui qui est obtenu dans le jus extrait de grains sains. Il se produit donc une diminution du

calcium. Il est possible que les champignons par les modifications qu'ils apportent à la constitution du grain ne permettent pas une extraction complète de cet élément.

TABLEAU IV

Rapports existant entre les éléments minéraux étudiés K/NH_4

N° du prélèvement	1	2	3	4	5	6	7
			Année 1954				
CHENIN : Belle Beille ...	1,56	1,73	1,60	1,89	3		
CHENIN : Rochefort	4,53	5,61	6,34	7,06	14,88 [1]		
CHENIN : Beaulieu	3,02	4,24	5,67	6,26	15,34 [1]		
CABERNET : Tigné.....	7,17	8,67	8,20	8,70	10	15,72 [2]	
CABERNET : Rochefort ..	6,60	8,64	12,89	11,45	19,17	12,43	16,55
GROSLOT : Beaulieu	2,47	3,10	4,29	4,29	5,13	5,6	
GROSLOT : Brissac	1,68	2,09	2,43	2,75	2,75		
MUSCADET	1,92	2,21	2,34	2,82	4,25		

[1] Moût de raisins pourris.
[2] Ce moût de Tigné a été extrait de raisins dont une partie était pourrie.

c) *Rapport K/Mg et K/Ca* : De la véraison à la maturité ces rapports augmentent sans suivre cependant la même progression. Le rapport K/Mg après avoir atteint une certaine valeur reste sensiblement stable tandis que le rapport K/Ca augmente continuellement. Ces deux rapports montrent clairement que le potassium est, dans les moûts, l'élément basique prédominant.

IV. — Conclusion :

Cette étude nous a permis de préciser la composition de quelques moûts de divers cépages cultivés dans notre région. En éliminant le cas un peu particulier du Pinot Chardonnay peu de différences apparaissent entre les teneurs en calcium et magnésium des moûts des différents cépages. Les teneurs en potassium montrent moins de régularité. Nous pensons que ces variations sont influencées par le facteur sol et surtout par le facteur fumure. Il est par contre semble-t-il assez intéressant de rapeler le comportement particulier du Cabernet franc vis-à-vis de l'ion ammonium. Il ne semble pas que le facteur sol intervienne. Les deux vignobles dans lesquels les prélèvements ont été faits sont plantés sur des terrains différents ; à Rochefort le sol provient de la décomposition des schistes, à Tigné il est constitué par les sables et graviers de l'Anjou. En 1951 et 1952 nous avons eu la possibilité de comparer des moûts de Cabernet et de Chenin cultivés sur des terrains voisins provenant de la décomposition de schiste et de noter le même comportement du Cabernet. Peut-être peut-on y voir un caractère de ce cépage dans le milieu angevin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) PEYNAUD (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins.
(2) JAULMES (P.). — Traité d'analyses des vins, Edit. Poulain, Montpellier, 223, 1951.
(3) MAUME et coll — Ann. Ecole Nationale d'Agriculture de Montpellier T. XXII F 1, p. 5 et suiv.
(4) DUVAL (C.). — Traité de microanalyse minérale. Edit. Presses Scientifiques Internationales, Paris 6e, **1**, 340, 1954.
(5) JAVILLIER (M.) et LAVOLLAY (J.). — Dosage du magnésium par la méthode à la 8-hydroxyquinoléine en Chimie Biologique et Chimie Agricole. *Ann. Fals. Fraudes*, **27**, 326-333, 1934.
(6) PEYNAUD (E.). — Sur les variations de l'azote du raisin au cours de la maturation. *Rev. Viticulture*, **90**, 213, 1939.
(7) PEYNAUD (E.) et MAURIE (A.). — Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du raisin au cours de la maturation. *Ann. Tech. Agric.*, 15, 1953.
(8) GENEVOIS. — *Ann. Brass. Dist.*, 328-337, 1934.
(9) FRANCOT (P.) et GEOFFROY (P.). — Le chlore, le calcium et le fer dans les vins et en particulier dans les vins de Champagne et les sous-produits de la champagnisation. *Bull. O. I. V.* nº 242, **106**, 1951.
(10) GENEVOIS. — *Ann. Brass. Dist.*, 337-338, 1939.
(11) FLANZY (M.) et LAMAZOU-BETBEDER (M.). — La potasse et l'indice de tartre dans les vins 1943, *C. R. Acad. Agric.*, **30**, 208, 1944.
(12) FLANZY (M.). — L'indice de tartre dans les vins. Signification météorique. *Ann. Agr. de l'I. N. R. A.*, **16**, 341, 1946.
(13) FRANC DE FERRIÈRES (P. J. J.). — Alimentation potassique de la vigne. *C. R. Acad. Agric* **35**, 480, 1949.

ÉTUDE D'UNE NOUVELLE BACTÉRIE MALOLACTIQUE

PAR

P. BARRE et **P. GALZY**

Station de Technologie agricole, Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École nationale d'Agriculture, Montpellier

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.
II. — Matériel et méthode.
III. — Description.
A. Étude morphologique.
B. Caractères physiologiques.
C. Caractères biochimiques.
D. Étude sur milieu naturel.
IV. — Discussion.
V. — Conclusion.
VI. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Dans ses « Études sur le vin » PASTEUR décrit sous le nom de « tourne » une maladie des vins caractérisée par une baisse d'acidité et un dégagement de gaz carbonique. Cette maladie était très répandue dans le midi de la France autrefois mais a disparu pratiquement grâce aux méthodes modernes de vinification.

Nous savons maintenant que deux phénomènes différents correspondent à la description de PASTEUR : la rétrogradation malolactique souvent considérée actuellement comme un élément favorable à la qualité des vins et la dégradation de l'acide tartrique par des bactéries propioniques qui constitue la tourne *sensu stricto*.

A la demande de M. le Professeur NÈGRE nous avons entrepris l'étude de la flore bactérienne des vins du Midi afin de mettre en évidence les fréquences relatives des bactéries malolactiques et des bactéries de tourne *sensu stricto* et d'étudier leurs propriétés respectives. Au cours de ce travail nous avons eu notre attention particulièrement attirée par une bactérie caractérisée par son extrême rusticité. Cette bactérie provenait d'un vin dont l'acidité avait été fortement dégradée. Son isolement a pu être effectué par un simple étalement en boîte de Pétri à la surface d'un milieu synthétique relativement simple (yeast extract Difco 0,5 p. 100, glucose 0,5 p. 100, gélose 4 p. 100). La croissance de petites colonies parfaitement isolées à la surface du milieu a rendu la purification particulièrement aisée.

Il est exceptionnel de trouver une bactérie malolactique susceptible de pousser en aérobiose d'une part et capable de donner une croissance abondante sur un milieu de culture aussi simple que celui utilisé d'autre part. Nous allons donc en donner rapidement la description ainsi que les principales propriétés.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

A. — Mode de culture

Les cultures sont faites, sauf indication contraire dans le texte, dans des tubes 18 × 18 renfermant 10 cc de milieu et bouchés au coton. Lorsque l'on désire une croissance en anaérobiose on place le tube sous pyrogallate et l'on bouche hermétiquement à l'aide d'un bouchon paraffiné.

Les stérilisations sont effectuées à l'autoclave, 40 minutes à 110°. Les vins et les jus de raisin ont été traités par filtration stérilisante.

— Le milieu de conservation est constitué par une solution renfermant 0,5 p. 100 de Yeast extract Difco et 0,5 p. 100 de glucose. Il est maintenu à 26°C.

— Le milieu solide renferme 0,5 p. 100 de Y. E. Difco, 0,5 p. 100 de glucose, 2 p. 100 de gélose.

— Les milieux spéciaux servant aux tests de détermination sont préparés suivant les directives de la Société des bactériologistes américains (1).

— Les milieux servant à tester l'attaque de substrats carbonés tels que : glucides, alcools, acides organiques, sont formés de 0,5 p. 100 de Y. E. Difco et de 2 p. 100 du composé à tester. Un résultat positif est mis en évidence à l'aide de trois méthodes : Néphélométrie, mesure de l'acidité totale et volatile, mesure du pH.

B. — Méthodes analytiques

Elles sont appliquées à des milieux de culture renfermant au départ 2 p. 100 d'un composé carboné.

— *Acides fixes* : Ils sont séparés par la méthode de MACHEBŒUF (2). Nous utilisons un développement de 26 cm : nous pouvons séparer ainsi de façon nette les acides tartrique, citrique, malique, lactique, succinique. La prise d'essai est de 30 μ 1.

— *Acides volatils* : Après distillation selon la méthode de DUCLAUX, on les caractérise sous forme de sels d'éthylamine par la méthode de JOLIVET (3). Le solvant employé est du butanol saturé d'eau. La révélation se fait par pulvérisation d'une solution alcoolique de vert de bromocrésol.

— *Acide formique* : La méthode précédente le confond pratiquement avec l'acide acétique. On applique complémentairement à l'analyse chromatographique la réaction colorimétrique suivante : Après distillation du milieu, on réduit deux gouttes par le magnésium chlorhydrique. On caractérise l'aldéhyde formique produit, par l'acide chromotropique (4).

— *Mannitol* : Il est mis en évidence par la technique utilisée par GAYON et DUBOURG (5).

— *Ethanol* : Il est dosé par la méthode FLANZY (6).

— *Anhydride carbonique* : On révèle sa présence au moyen d'une cloche de DURHAM immergée dans un tube renfermant le milieu liquide. On emploie parallèlement la méthode de GUERRA (7).

III. — DESCRIPTION

A. — Étude morphologique

a) Examen macroscopique.

— Sur milieu solide en tube incliné, un ensemencement avec 2 gouttes de milieu liquide donne une culture assez riche avec formation de plages de croissances peu définies mais étendues et de colonies nettes (en moyenne une vingtaine par tube) entre 0,5 mm et 1,5 mm de largeur.

Ces dernières présentent un polymorphisme typique : au départ, elles sont petites, brillantes, blanc nacré, convexes, à bord lisse ou légèrement ondulé. Il y a évolution vers une teinte beige clair à marron foncé. Les colonies deviennent à bord plus ondulé, souvent même elles acquièrent un profil protubérant. La pigmentation se développe très souvent en commençant par l'apex.

Par repiquage direct de culture solide à culture solide l'apparition des colonies est plus rapide ; elles sont beaucoup plus nombreuses. La formation du pigment n'est pas accélérée.

— Sur gélose en piqûre, croissance faible, filiforme, de haut jusqu'en bas.

— En gélose profonde, donne des colonies plates, rondes, avec un point sombre au milieu.

— Culture en milieu liquide : on observe un trouble très fin qui disparaît au bout de 2 à 3 jours. Il y a formation d'un dépôt blanc, dense, au fond du tube.

b) **Examen microscopique.**

Ce sont des bâtonnets. Les formes dominantes ont de 2,5 à 4,5 μ de long sur 1 μ de large. On note la présence de quelques courtes chaînes de 2 à 3 éléments. La bactérie n'est pas mobile.

Sur culture vieille (trois mois) l'aspect n'est guère différent, on note une proportion plus grande de chaînes et quelques amas de cellules. On n'observe aucune différence morphologique sensible selon le pH du milieu de culture.

Sur quelques rares milieux de culture on observe la formation de filaments sans cloisonnement apparent allant jusqu'à 30 μ de long. Ces formes sont fréquentes et même dominantes sur jus de raisin, sur milieu à base d'arabinose et sur pomme de terre.

La bactérie est gram +.

La réaction de MOELLER ne permet pas de mettre en évidence de spores.

Il n'y a pas de cils.

B. — Caractères physiologiques

1. — Action de la température

La température optimum de croissance est comprise entre 27 et 32°C. Elle correspond à l'apparition d'un trouble net au bout d'un jour de culture.

A 37°C il n'y a développement qu'au bout de 15 jours.

La température maximum est de 40°C.

2. — Action du pH.

On ajuste les pH avec de la potasse ou de l'acide sulfurique. Les pH inférieurs à 6,5 ont été également ajustés à l'acide tartrique. Les résultats sont évalués par estimation du trouble, au bout d'une semaine de croissance. Il n'y a aucune différence entre l'action de l'acide tartrique et de l'acide sulfurique.

A pH 3,5 la croissance est très faible. Elle s'élève régulièrement

jusqu'à pH 5,5 et reste ensuite stationnaire jusqu'à pH 7,5. Elle décroît ensuite régulièrement. A pH 8,6, elle est encore bonne. Le pH maximum est légèrement supérieur à 9.

3. — Action de l'air.

Il n'y a guère de différences entre une culture liquide faite dans les conditions normales et une culture liquide placée sous pyrogallate.

Les cultures sur gélose incliné poussent de façon plus rapides et plus abondantes lorsqu'on les place sous pyrogallate.

L'air a une action sensible sur la pigmentation des colonies ainsi que le prouve le test suivant :

6 tubes de milieu solide sont ensemencés et aussitôt placés sous pyrogallate. On attend le développement des colonies qui sont blanches, pour enlever stérilement le bouchon paraffiné et le pyrogallate de 3 de ces tubes. Au bout de 10 jours les trois tubes maintenus en anaérobiose renferment toujours des colonies blanches ou très légèrement jaunâtres. Les tubes sans pyrogallate renferment des colonies présentant une pigmentation nette.

On ne peut cependant affirmer que l'apparition du chromogène est sous la dépendance de l'air d'autant plus que les tubes laissés sous pyrogallate présentent à leur tour des colonies légèrement colorées au bout de 1 mois et demi. On peut cependant dire que la présence d'air accélère la formation du pigment.

4. — Principaux tests.

Il n'y a pas de dégradation de l'albumine .

Il n'y a pas de formation d'Indol, d'acétyl-méthylcarbinol, de SH_2, de nitrites à partir des nitrates.

Le test au rouge de méthyle est négatif.

Il n'y a pas de catalase.

Il n'y a ni coagulation, ni digestion du lait glucosé. On note une légère acidification du lait tournesolé.

L'examen macroscopique d'une culture sur pomme de terre ne permet de déceler aucun signe de croissance. Toutefois un grattage observé au microscope montre un léger développement microbien avec une forte proportion de formes très longues.

C. — Étude biochimique

Elle a pour but de déterminer les substances carbonées permettant un développement bactérien et de mettre en évidence les principaux produits fournis par l'attaque de ces substances.

L'étude des corps fermentescibles est faite sur des milieux de cultures

contenus dans des flacons de 500 cc. On caractérise la formation, dans tous ces milieux, des acides fixes et volatils par chromatographie ; on teste le dégagement de CO_2.

Dans quelques cas particuliers, on cherche à mettre en évidence l'éthanol et le mannitol.

1. — Glucides.

a) *Les Pentoses* : L'arabinose et le xylose sont attaqués, le rhamnose ne l'est pas.

Production d'acide par rapport au trouble bactérien, et rapport $\frac{\text{Acidité volatile}}{\text{Acidité totale}}$, sont plus forts que dans tous les autres cas, mis à part le lévulose.

Il n'y a pas de production d'alcool ni de CO_2. Il y a formation d'acide lactique et acétique.

b) *Les aldohexoses* : Galactose et glucose sont fermentés. Le mannose ne l'est pas.

Cette attaque est caractérisée par un développement bactérien et une production d'acide, faibles.

Tableau I

Bactérie L., *attaque des glucides.*

	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Glucose	Levulose	Galactose	Mannose	Sorbose	Saccharose	Lactose	Maltose	Raffinose
Intensité du trouble bactérien . .	++	++	—	+	+++	+	—	—	+++	+f	++++	+
pH Initial	5	5,1	5,4	5,8	5,1	5,8	6,1	5,4	5,8	5,6	6	5,8
pH Final	3,7	3,75	5,3	4,4	3,9	4,8	5,9	5,3	3,9	4,7	3,65	4,25
Acidité totale	36	30	Traces	10,5	32,5	9,5	Traces	Traces	18	6	36	10,5
Acidité volatile . .	18	18	Traces	2,5	16,3	1,5	Traces	Traces	6,5	1,25	9	2,3

Les acidités sont données en méq./l.
Les titrations ont été faites à la phénol-phtaléine.
Le nombre de croix est en relation avec l'évaluation du trouble bactérien par Néphélométrie.
+ f = trouble très léger.

Le rapport $\frac{\text{Acidité volatile}}{\text{Acidité totale}}$ est peu élevé. Il y a formation d'acide lactique, d'acide acétique, de CO_2. On a recherché l'alcool dans le milieu glucosé : le résultat est positif.

c) *Les cétohexoses.* — Le lévulose est attaqué. Le sorbose ne l'est pas.

La fermentation du lévulose donne une forte proportion d'acide acé-

tique. Elle produit également de l'acide lactique, du CO_2, du mannitol, mais pas d'alcool.

d) *Les holosides.* — Ils donnent de l'acide lactique, de l'acide acétique et du CO_2.

On a testé l'alcool dans un milieu à base de maltose, le résultat est positif.

On doit remarquer que l'attaque sur lactose est très faible.

e) *Polyholosides.* — L'amidon n'est pas attaqué.

2. — Alcools.

On a vérifié l'action de la bactérie sur l'éthanol, le glycérol, le mannitol et le sorbitol. Aucun de ces substrats ne donne lieu à un développement microbien.

3. — Acides.

Les acides tartrique, citrique, malique, lactique et succinique sont essayés comme substrats carbonés ; deux séries sont faites à pH 6 et 4.

Un seul de ces essais a donné un résultat positif : c'est l'acide malique à pH 4.

On part d'une souche conservée sur milieu Y. E.-glucose. Le premier repiquage sur milieu Y. E. 0,5 p. 100-acide malique 2 p. 100, donne lieu à l'apparition brutale d'un trouble net au bout d'un mois de culture. Un deuxième repiquage à partir de cet essai donne une croissance nette au bout d'une semaine. Le troisième repiquage montre un résultat positif au bout de 2 jours. C'est le temps d'apparition d'une trouble net pour la souche adaptée.

Nous en sommes actuellement au 6e repiquage sur milieu Y. E. 0,5 p. 100-acide malique 2 p. 100-pH 4 ; la souche est encore très vivace.

Les produits de dégradation de l'acide malique sont l'acide lactique et le CO_2. On trouve des traces d'acide volatil.

Par repiquage d'une souche adaptée sur milieu solide Y. E.-glucose, on note une croissance normale dans la masse et une croissance anormalement faible en surface inclinée. Il semblerait que l'adaptation de la bactérie à l'acide malique s'accompagnerait d'une diminution des possibilités de croissance en présence d'air.

D. — Étude sur milieu naturel

1. — Jus de raisin.

Après réglage du pH respectivement à 4 et 6,5, on stérilise par filtration. Dans les deux séries, on obtient une croissance extrêmement abon-

dante ; elle est caractérisée par la présence de bactéries longues et droites (jusqu'à 15 μ) et de formes très longues et flexueuses.

L'étude biochimique a été effectuée pour le jus à pH = 4 ; on a mis en évidence une acidification intense et en particulier la formation importante d'acide acétique (50 meq.) ; on a trouvé également de l'acide formique à une dose au moins égale à 40 mg/l. Il se forme également des quantités importantes de mannite ; par contre la présence d'alcool n'a pu être mise en évidence. Ces deux derniers résultats suggèrent que le lévulose pourrait être attaqué avant le glucose.

Le développement de la bactérie sur un jus de raisin du commerce (pH = 3,4) stérilisé à l'autoclave (40 m, 110°) a été étudié. La croissance est beaucoup plus faible que précédemment ; il se forme dans ce cas beaucoup moins d'acidité volatile et on n'a pu mettre en évidence ni mannite, ni alcool. L'examen microscopique révèle ici encore la présence de formes bactériennes très longues.

2. — Vin.

Ils ont été stérilisés par filtration. Un premier essai a été effectué sur un vin très acide (pH = 2,9) en opérant sur le vin naturel d'une part et sur le vin neutralisé partiellement à la potasse jusqu'à pH = 3,4 et 4 d'autre part. L'ensemencement avec une culture active a permis un développement bactérien dans les trois cas ; un repiquage a pu être effectué à partir de ces cultures sur les mêmes vins. La croissance a été plus faible à pH = 2,9 qu'à pH 3,4 et 4 ; l'importance du trouble bactérien n'était pas suffisante pour justifier une étude chimique du vin.

Un deuxième essai a été effectué avec un vin dont les principales caractéristiques étaient les suivantes : pH = 3,3 . Degré alcoolique : 9°. Acidité totale : 5. SO_2 libre : 30 mg/l.

Il n'y a pas eu de croissance en trois semaines.

IV. — DISCUSSION

Les caractères généraux de cette bactérie la font rentrer dans le groupe des Lactobacilles hétérofermentatifs. Nous la comparerons aux quatre espèces reconnues dans ce groupe par la classification de Bergey (8).

Notons, tout d'abord, une particularité importante : la présence d'un pigment brun ; bien qu'une variété pigmentée de *L. brevis* ait été citée par Breed et Pederson (9), ce caractère la différencie nettement de toutes les autres bactéries précédemment décrites.

La fermentation de l'arabinose qui constitue un des tests fondamentaux de la classification, éloigne, sans doute possible, la souche *L.* de *L. fermenti*.

Les caractéristiques physiologiques de la bactérie L. et de *L. pastorianus* sont très proches : relative facilité de croissance aérobie — formation de colonies en surface dans les tubes de gélose inclinée — optimum et maximum de température — pH optimum et possibilité de croissance jusqu'à pH = 9. Au point de vue biochimique elles diffèrent par l'attaque du mannitol et du xylose. Enfin les caractères morphologiques et microscopiques sont très différents : on ne retrouve pas l'aspect rhizoïde des colonies de *L. pastorianus* chez la bactérie L ; cette dernière présente des bâtonnets relativement courts par rapport aux dimensions de *L. pastorianus*. Cependant, cette différence est atténuée par la présence de formes très longues dans les cultures sur arabinose jus de raisin et pomme de terre de la bactérie L.

L. buchneri présente une très faible croissance en surface ainsi que des températures optimum (32-37°) et maximum (45°) plus élevées. Elle diffère également de L. par l'attaque positive du mannose et par une certaine activité sur quelques alcools.

L. brevis diffère également de L. par une très faible croissance en surface mais présente des températures optima et maxima plus voisines. Dans le domaine biochimique *L. brevis* est caractérisée par une activité limitée vis-à-vis du groupe saccharose-lactose-raffinose ; la bactérie L. fermente très faiblement le lactose, assez faiblement le raffinose, mais très vigoureusement le saccharose.

Il reste maintenant à apprécier l'importance relative des différences constatées. Nous pourrons nous aider, pour ce travail, de l'étude de quelques exemples choisis parmi les bactéries du vin précédemment décrites. Fornachon (10) fait remarquer qu'il est normal que des souches nouvellement isolées diffèrent légèrement des descriptions types, faites pour les diverses espèces par Pederson (11) en 1938. C'est en tenant compte de ce point de vue qu'il assimile ses bactéries types III et IV à *L. buchneri*, malgré une légère différence de température optimum, l'absence de fermentation du mannose, et, en ce qui concerne le type IV, l'absence de fermentation du lactose. De même, *L. mannitopoeus* est rangé dans cette espèce malgré la non fermentation du lactose.

Les types II et IV de Fornachon, et ML_1 de Bidan (12) dont les différences avec *L. fermenti* sont visibles dans les tableaux II et III, sont cependant assimilés à cette espèce.

Par contre, le type I de Fornachon et le Lactobacille décrit par Dupuy (13) en 1957 n'ont pas trouvé place dans le schéma de Pederson. Ils sont à rapprocher du groupe « Inactif » encore insuffisamment décrit, et pourraient constituer des espèces nouvelles.

A la lumière de ces exemples, on pourrait rapprocher la souche L. de *L buchneri* : *L. mannitopoeus* a été placé là, bien que différant aussi de cette espèce par les températures optima et maxima et par la fermenta-

TABLEAU II

Lactobacilles Hétérofermentatifs : attaque des glucides et des alcools.

	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Glucose	Levulose	Galactose	Mannose	Sorbose	Saccharose	Lactose	Maltose	Raffinose	Amidon	Éthanol	Glycérol	Mannitol	Sorbitol
L. Buchneri	+	+	±	+	+	+	+		+	+	+	+	±		±	±	±
L. Mannitopoeus				+	+	+			+	+	+					+	
Fornachon type III				+	+	+			+	+	+						
Fornachon type IV				+	+	+			+	+	+						
L.				+	+	+			+	+	+						
L. Pastorianus				+	+	+			+	+	+						
L. Brevis		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
L. Fermenti		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
L. intermédium		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
M. L_1 (Bidan)		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
L. Gayoni		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
Fornachon type V		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
Fornachon type II		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
Lactobacille Dupuy		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
Fornachon type I		+		+	+	+	±		+	+	+	+					
L. Hilgardii		+		+	+	+	±		+	+	+	+					

+ Attaque positive. — Attaque négative. ± Attaque positive ou négative. + f Attaque faible.

TABLEAU III

Lactobacilles Hétérofermentatifs : morphologie et physiologie.

	Dimensions	Pigment	Caille le lait	Lait tournesolé		Température optimum	Résistance à l'alcool
				Réduction	Acidification		
L. Buchneri	0,35 × 0,7 — 4	—	—	—	±	32-37°	18-20°
L. Mannitopoeus		—	—	—	—	26-34°	
Fornachon type III	0,6 — 0,8 × 2 — 4	—	—	—	—	30-35°	16-18°
Fornachon type IV	0,6 — 0,8 × 2 — 4	—	—	—	—	30-35°	18-20°
L.	1 × 3 — 4,5	+	—	—	+	27-32°	18-20°
L. Pastorianus	0,5 — 1 × 7 — 35	—	—	—	+	29-33°	
L. Brevis	0,7 — 1 × 2 — 4	—	±		+	30°	15-18°
L. Fermenti	0,5 — 1 × 3 — 15	—	—	+	±	41-42°	15-18°
L. intermédium	0,8 — 0,9 × 1,2	—					
M. L_1 Bidan	1 × 2 — 2,5	—	+	+	+	25-37°	20°
L. Gayoni		—					
Fornachon type V	0,6 — 0,8 × 2 — 4	—	—	—	—	30-35°	18-20°
Fornachon type II	0,6 — 0,8 × 2 — 4	—	—	—	—	30-35°	18-20°
Lactobacille Dupuy		—	—	—	—	27°	
Fornachon type I	0,4 — 0,6 × 2 — 4	—	—	—	—	25-30°	20-21°
L. Hilgardii	0,5 — 0,8 × 2 — 4	—	—	—			

tion de certain sucre. Cependant la croissance relativement importante de la souche L. en surface dans les tubes de gélose inclinée, paraît un caractère assez important pour la séparer de *L. buchneri*. Notons par ailleurs, que L. diffère en outre de *L. mannitopoeus* par l'attaque du lactose, la non fermentescibilité de l'acide citrique et par une activité plus réduite vis-à-vis du glucose, du raffinose et du galactose.

La croissance au contact de l'air de L. paraît également de nature à l'éloigner de *L. brevis* malgré tous les points de ressemblance déjà cités.

Ce caractère la rapproche au contraire de *L. pastorianus*. La fermentation du xylose étant considérée par PEDERSON (11) comme ayant peu de valeur au point de vue test, par rapport à la fermentation d'autres sucres, il semblerait plus logique de rapprocher la souche L. de cette dernière espèce.

Cependant on doit noter que de nombreuses souches isolées du vin depuis le travail de PEDERSON, rentrent difficilement dans le cadre de la classification existante. Il semble prudent dans ces conditions, de se borner à décrire fidèlement une souche nouvellement isolée en attendant une mise en ordre ultérieure de la classification.

V. — CONCLUSION

Nous avons isolé du vin et décrit un Lactobacille hétérofermentatif présentant des caractères peu fréquents : facilité de croissance sur gélose inclinée, pigmentation. Nous avons discuté sa place dans la systématique.

Nous avons signalé son extrême simplicité de culture et sa facile adaptation à l'acide malique qui pourrait en faire un ferment malolactique intéressant pour les vins secs.

Toutefois sur vin contenant encore de fortes teneurs en lévulose, elle est susceptible de se conduire comme un ferment mannitique.

Des essais ultérieurs seront effectués pour étudier ses conditions et ses limites d'emplois.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. — Manual of Microbiological Methods, Routine tests for identification of Bacteria, 1957 (Mc Graw Hill Book Company).

(2) CHEFTEL (R. T.), MUNIER (R.) et MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques, hydrosolubles et non volatils. *Bulletin Société Chimie Biologique*, **33**, 7, p. 840-845, 1951.

(3) JOLIVET (R.). — Contribution à l'étude des fermentations. Analyse chromatographique des acides gras volatils. *Ann. Inst. Agr. d'Algérie*, **10**, fascicule 6, 1957.

(4) PEZEZ (M.), POIRIER (P.). — Méthodes et réactions de l'analyse organique, **3**, p. 165 (Masson et Cie), 1954.

(5) GAYON (U.) et DUBOURG (E.). — Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. *Ann. Inst. Pasteur*, **15**, p. 527-569, 1901.
(6) FLANZY (M.), BOUZIGUES (Mme L.) et BOUZIGUES (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfo-chromique. *Ann. Techn. Agric.*, **4**, p. 397, 1955.
(7) LANGERON (M.) et GUERRA (M.). — Nouvelles recherches de Zymologie médicale. *Ann. de Parasitologie*, **16**, p. 36, 1938.
(8) BREED (R. S.), MURRAY (E. G. D.), SMITH (N. R.). — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7e Édition (The Williams and Wilkins Company), 1957.
(9) BREED (R. S.), PEDERSON (C. S.). — The organisms causing rusty spot in cheddar cheese. *Journ. of Bact.*, **36**, p. 667, 1938.
(10) FORNACHON (J. C. M.). — Bacterial spoilage in Fortified Wines (Australian Wine Board), 1943.
(11) PEDERSON (C. S.). — The Gas producing species of Genus Lactobacillus. *Journ. of Bact.*, **35**, p. 95-108, 1938.
(12) BIDAN (P.). — Sur quelques bactéries isolées de vin en fermentation malolactique. *Ann. Techn. Agr.*, IV, p. 597-617, 1956.
(13) DUPUY (P.). — Une nouvelle altération Bactérienne dans les vins de liqueurs. *Ann. Techn. Agr.*, **1**, p. 93-102, 1957.

ÉTUDE ET DÉTERMINATION D'UNE LEVURE OSMOPHILE

PAR

P. BARRE et P. GALZY (1)

Station de Technologie agricole, Centre de Recherches agronomiques du Midi, École nationale d'Agriculture, Montpellier

I. — Introduction

Nous avons isolé en 1955 une levure dans un lot de confiture en fermentation. Les caractéristiques de cette levure pouvaient la rendre dangereuse pour toutes les conserves basées sur une forte concentration en sucre (confiture-miel-jus de fruit concentrés, etc). Il nous a paru intéressant d'en faire une étude que nous allons résumer ici.

II. — Détermination

La détermination a été conduite en suivant les principes définis par LODDER et KREGER VAN RIJ (1). Cependant la description de la levure sur milieu gélosé et en milieu liquide n'a pas été effectuée sur extrait de malt mais sur le milieu dont nous nous servons couramment (Yeast extract Difco 0,5 p. 100 glucose 0,5 p. 100).

CROISSANCE SUR MILIEU GÉLOSÉ.

Après trois jours à une température de 25°, les cellules sont rondes (2,5-7,5) μ. Parfois, il se forme des chaînettes non ramifiées de 3 à 4 cellules. Les colonies sont blanches, lisses et brillantes.

CROISSANCE SUR MILIEU LIQUIDE.

Après trois semaines, on observe un dépôt fin et peu abondant.

(1) Avec la collaboration technique de Mlle M. AZEMA.

Sporulation.

Sur milieu de Fowel on observe des figures de copulation mais pas d'asques.

Sur tranche de carotte, il se forme de nombreuses figures de copulation et des asques à 2 et 3 spores.

Fermentation des sucres.

Glucose	+	Galactose	—
Maltose	+	Lactose	—
Saccharose	+	Raffinose	—

Assimilation des sucres.

Glucose	+	Galactose	—
Maltose	+	Lactose	—
Saccharose	+		

Croissance sur alcool.

Positive mais très faible.

Assimilation des nitrates.

Négative.

Cette levure présente de nombreuses ressemblances avec *Saccharomyces hétérogenicus* Osterwalder.

Les tests de fermentation et d'assimilation des sucres, d'assimilation des nitrates et de croissance sur alcool sont rigoureusement identiques.

Par contre, on observe des différences importantes dans la forme et les dimensions des cellules.

La présence d'une conjugaison précédant immédiatement la sporulation chez la souche que nous venons de décrire constitue également une différence importante.

On peut considérer que ces deux différences peuvent se ramener à une seule : les places relatives de la conjugaison et de la meïose dans le cycle sexuel.

En effet, dans la souche étudiée, la meïose et la sporulation suivent directement la copulation ; il en résulte que les cellules sont haploïdes et qu'il est normal qu'elles soient rondes et relativement petites.

Par contre, chez *S. heterogenicus*, la copulation doit s'effectuer dès la germination des spores ; cette levure est diploïde et la meïose se produit en fin de cycle avant la sporulation : la taille et la forme de ses cellules sont celles d'une levure diploïde.

Il faut noter également que la levure décrite est homothallique mais nous ne savons rien à cet égard des propriétés de *S. heterogenicus*.

En définitive, il nous paraît difficile de rattacher cette souche à *S. heterogenicus* à cause de l'importance du caractère qui les sépare ; en effet, ce caractère était utilisé autrefois (2) pour séparer les genres Saccharomyces et Zygosaccharomyces. Nous nous proposons donc de la dénommer : *Saccharomyces osmophilus nov. spec.*

Nous noterons que cette espèce nouvelle de levure osmophile est haploïde (type zygosaccharomyces) comme la plupart des souches osmophiles précédemment décrites (3) : ces dernières se rattachent aux espèces suivantes :

Saccharomyces rouxii BOUTROUX.
Saccharomyces mellis FABIAN et QUINET.
Saccharomyces roseï GUILLIERMOND.
Saccharomyces acidifaciens NICKERSON.

III. Étude technologigue

Nous avons dosé les sucres par la méthode G. BERTRAND, l'alcool par la méthode FLANZY (4). L'acidité volatile, dosée par la méthode JAULMES, est exprimée en gramme d'acide sulfurique par litre.

La résistance aux fortes teneurs en sucre a été testée en cultivant cette levure en erlenmeyer de 100 ml contenant 50 ml de milieu de culture (Yeast extract Difco 0,5 p. 100 et glucose) ; on ensemence avec 5 ml d'une préculture contenant 200 g/l de glucose et on dose sucre résiduel et alcool 20 jours après (Tableau I).

TABLEAU I

Sucre initial gr/l	Sucre résiduel gr/l	Alcool formé	Acidité volatile
200	36	6°7	0,1
200	3c	7°	0,1
400	250	6°4	0,2
400	250	6°3	0,2
500	388	5°1	0,2
500	362	5°7	0,2
600	468	4°4	0,2
600	482	4°3	0,2

Nous n'avons pas tenu compte des pertes d'alcool à l'étuve, ni de la concentration des solutions lors de leur passage à l'autoclave.

Ces résultats montrent que cette levure a encore un métabolisme actif à des concentrations de l'ordre de 600 g de sucre par litre. Vu la quantité d'alcool fourni dans ce dernier cas (4°4) il est prévisible que son métabolisme doit aussi pouvoir se manifester à des concentrations supérieures.

On observe une baisse progressive de la consommation de sucre et de la production d'alcool lorsqu'on augmente la concentration en sucre du milieu de culture entre 200 et 600 g/l. Ce résultat confirme les observations antérieures qui montraient que les levures dites « osmophiles » sont en réalité simplement des levures résistantes à de fortes concentrations de sucre. Cette levure est également caractérisée par la production d'une très faible teneur en acidité volatile.

Ces propriétés font penser que cette levure peut avoir un intérêt pour la fermentation de milieux très riches en sucre, en particulier les vins cuits de la Palette (5). Il faudrait vérifier dans les conditions pratiques de production de ce vin, si la fermentation est suffisamment active et si le rendement sucre/alcool est acceptable.

IV. Conclusion

Nous venons de décrire une levure qui présente toutes les caractéristiques d'une levure « osmophile ». Son étude taxonomique nous a conduit à en faire une nouvelle espèce que nous proposons d'appeler : Saccharomyces osmophilus nov. spec.

Son intérêt technologique sera précisé dans les conditions de la pratique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Lodder (J.) et Kreger van Rij (N. J. W.). — The Yeasts. A Taxonomic Study. North holland publishing company 1952.
(2) Guillermond (A.). — Les levures 1912. Douin et fils, éditeurs.
(3) Ingram (M.). — Les propriétés physiologiques des levures osmophiles. *Revue des Fermentations*, XIV, n° 1, p. 23-33, 1960.
(4) Flanzy (M.), Bouzigues (Mme L.), Bouzigues (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange Sulfo-chromique. *Ann. Techn. Agr.*, **4**, p. 397, 1955.
(5) Galet (P.). — Cépages et vignobles de France. T. II, p. 933, 1957.

SÉPARATION PAR CHROMATOCRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS ET DOSAGE DES ACIDES LACTIQUE, SUCCINIQUE ET MALIQUE DU VIN

PAR

R. CORDONNIER, Cl. BIZEAU

avec la collaboration technique de Mme BIZEAU

Station de Technologie végétale, Centre de Recherches agronomiques du Midi, École nationale d'Agriculture, Montpellier.

Les différentes techniques de séparation des acides fixes du vin permettant le dosage de l'acide malique ont déjà fait l'objet d'une analyse critique parue dans cette revue (1) : La séparation de l'acide malique, en particulier des acides tartrique et citrique, par des procédés chimiques offrent des difficultés que l'on tourne :

a) dans les techniques microbiologiques, par l'utilisation d'une réaction de décarboxylation enzymatique spécifique (2) ; mais ces techniques, en raison de l'équipement nécessaire, ne sont pas à la portée de tous les laboratoires.

b) dans les techniques chimiques, en dosant en même temps que l'acide malique, les acides tartrique et citrique qu'il faut donc doser également par ailleurs, ce qui complique la méthode et en diminue la précision (3).

Cependant la chromatographie d'échange d'ions permet de séparer ces différents acides et offre l'avantage de pouvoir en doser plusieurs au cours d'une seule manipulation.

Mais les techniques proposées comportent, au stade du déplacement des acides, de nombreux changements d'éluant ou la réalisation d'un gradient de concentration de l'éluant ; ce qui rend difficile, du point de vue pratique, leur utilisation pour le dosage en série d'un acide déterminé, tout au moins sans une adaptation préalable dans le sens d'une simplification de l'élution au moyen d'un seul éluant.

L'objet de ce travail a tout d'abord été de rechercher dans quelle mesure une telle adaptation était réalisable en ce qui concerne l'acide malique.

Par la suite il s'est trouvé que la technique d'isolement, mise au point pour cet acide, permettait de séparer suffisament bien les acides lactique et succinique pour que leur dosage puisse être également envisagé au cours de la même manipulation.

Parmi les techniques possibles, celle de Harris Busch, Robert Hurlbert et Von Potter (4) nous a semblé particulièrement intéressante car elle offre les avantages suivants : élution relativement rapide des acides qui nous intéressent ici, leur dosage facile après élimination de l'éluant et enfin isolement suffisamment bon de l'acide malique.

Nous avons vérifié en particulier que cet acide est très bien séparé des acides tartrique et citrique ce qui n'est pas le cas dans la méthode très classique de Gocdban et Stark : échangeur anionique ($CO_3^=$), éluant carbonate d'Ammonium (5).

La méthode non modifiée consiste à fixer les acides sur Dowex 1 × 8 mis sous forme formiate et à les déplacer par de l'acide formique dont la concentration varie au cours de l'élution de 0 à 5 N.

A. — DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE A UN ÉLUANT

1. — Préparation de la résine (Dowex 1 × 8 100-200 meshs Cl^-)

Il est intéressant de préparer la quantité de résine suffisante pour constituer un stock assez abondant, car la partie la plus délicate de la technique est d'établir le diagramme d'élution des acides qu'il est recommandé de refaire avec chaque préparation de résine nouvelle.

La résine est mise en suspension dans l'eau distillée et les particules les plus fines sont décantées. Elle est ensuite introduite dans une grande colonne et mise sous forme Formiate par percolation d'une solution de Formiate 3 M jusqu'à réaction négative de l'effluent au Nitrate d'Argent. Il faut environ 5 l de Formiate pour 400 cm^3 de résine.

Après rinçage à l'eau distillée, la résine est conservée pâteuse en flacon, au froid de préférence.

2. — Colonnes

Batterie de six colonnes (diamètre 1,2 cm, hauteur 35 cm, robinet à la base) contenant chacune 20 cm^3 de résine introduite de façon homogène. Le lit de résine est retenu à ses deux extrémités par un tampon de coton de verre.

Un certain volume d'eau est maintenu au-dessus de la résine afin d'en éviter la fissuration.

3. — **Eluant**

Acide Formique 0,75 N.

4. — **Appareillage d'élution**

L'éluant est stocké dans un flacon de WOOLF à une tubulure inférieure fermée par un robinet, d'où il sera réparti par gravité dans la batterie de colonne par l'intermédiaire d'une rampe en verre à six départs fermés par un robinet, connectée au flacon de WOOLF et aux colonnes avec du tuyau plastique souple.

La connection colonne-tuyau plastique est réalisée au moyen d'un tube de verre fixé à l'orifice supérieur de la colonne par un bouchon de matière plastique.

5. — **Régénération des colonnes**

Après utilisation chaque colonne est régénérée par 50 cm³ d'acide Formique 50 p. 100 et rincée à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent (environ 400 cm³ d'eau).

6. — **Protocole expérimental de séparation des acides**

Après avoir fait affleurer l'eau au niveau supérieur de la résine, on introduit sur la colonne 10 cm³ de moût ou de vin préalablement filtré (le vin est décarboniqué s'il est riche en CO_2) qu'on laisse s'écouler goutte à goutte jusqu'à ce que le liquide atteigne le niveau supérieur de la résine.

La colonne est alors rincée avec 60 cm³ d'eau distillée dont le niveau, en fin de rinçage, est amené, comme dans les opérations précédentes, à la partie supérieure de la résine.

Il est en effet important de ne pas laisser s'introduire de l'air dans le lit de la résine.

On passe ensuite à l'élution avec l'acide Formique 0,75 N à la vitesse de 1 cm³/minute après avoir mis une éprouvette graduée sous la colonne afin de mesurer les volumes d'effluent.

Les acides passent dans l'ordre suivant : lactique, succinique, malique et, très loin après l'acide malique, l'acide tartrique mal séparé de l'acide citrique.

PRÉLÈVEMENT DES ACIDES.

1° *Acide Lactique.* — Les 25 premiers cm³ d'effluent sont rejetés ; une fiole jaugée de 25 cm³, est alors placée sous la colonne pour recueillir l'acide lactique entre les 25e et 50e cm³ d'effluent.

2° *Acide Succinique.* — Les 10 cm³ d'effluent suivant la fraction lactique sont rejetés puis une fiole jaugée de 75 cm³ (contenant 18 cm³

d'eau distillée) est placée sous la colonne pour recueillir l'acide Succinique entre le 60e et le 117e cm³.

3° *Acide Malique.* — Sitôt après le passage du 117e cm³ d'effluent, on met en place une fiole jaugée de 100 cm³ pour recueillir l'acide Malique entre les 117e et 217e cm³.

Contrôle de la pureté des fractions.

La bonne séparation des acides Succinique et Malique est contrôlée de temps à autre par chromatographie d'une fraction intermédiaire d'effluent de 2 cm³ du 115e au 117e cm³.

La pureté de chaque fraction est également contrôlée chromatographiquement afin de se mettre à l'abri d'un accident de fractionnement qui pourrait éventuellement se produire.

Le contrôle est opéré sur une partie aliquote de 2 cm³ de chaque fraction évaporée à l'étuve sous vide à 35° pour éviter toute perte d'acide et en reprenant le résidu sec par le minimum d'eau.

La concentration peut se faire aussi au B. M. mais il faut alors éviter d'aller jusqu'à siccité.

Remarques.

1. — Ce protocole a été établi à partir des données fournies par les diagrammes de six séparations sur six colonnes contenant la même résine.

Il ne correspond pas exactement aux positions de début et de fin de passage des acides (voir le tableau I p. 357) car, un volume de sécurité a été prévu avant et après chaque acide; on observe parfois en effet, d'une séparation à l'autre, un léger décalage dans ces positions de passage qui est de l'ordre de quelques cm³ d'effluent mais qui n'a jamais excédé le volume d'effluent séparant chaque acide, (voir Justification de la Technique et tableau I, p. 357) à l'exception cependant du volume d'effluent séparant l'acide succinique de l'acide malique.

L'isolement suffisant de chaque acide a rendu possible ces volumes de sécurité (voir le diagramme de séparation (fig. 4).

2. — Ce protocole expérimental n'est valable que pour la préparation de résine avec laquelle il a été établi mais il reste cependant du même ordre, dans la position du cœur de chaque fraction pour des préparations de lots différents de résine.

Il donne donc d'utiles indications pour établir rapidement le diagramme d'élution d'un acide déterminé avec un lot de résine utilisé pour la première fois, surtout si on ne dispose pas d'un collecteur de fractions.

Par exemple, pour l'acide malique il suffit de tester quatre colonnes

contenant la même résine avec quatre vins différents. A partir du 100e cm³ d'effluent on recueille :

— *1 fraction de 10 cm³ du 100e au 110e cm³.*

— *6 fractions de 2,5 cm³ du 110e au 125e cm³, dans lesquelles on trouvera la fin du passage de l'acide succinique et le début de l'acide malique.*

— *1 fraction de 75 cm³ du 125e au 200e cm³.*

— *4 fractions de 2,5 cm³ du 200e au 215e cm³, dans l'une desquelles on trouvera la fin du passage de l'acide malique.*

Les acides seront repérés par chromatographie de chaque fraction.

On procéderait de même pour les acides lactique et succinique en encadrant le cœur du passage de chaque acide par un nombre suffisant de fractions de 2,5 cm³.

7. — **Dosage des acides**

a) *Succinique et malique.* — Une partie aliquote des fractions Succinique et malique (50 cm³ pour un dosage en simple, 35 cm³ pour un dosage en double) est évaporée en deux temps dans un cristallisoir (diamètre 6,7 cm, profondeur 4 cm) : tout d'abord jusqu'à 10 cm³ au B. M. bouillant puis jusqu'à siccité sous vide (environ 15 mm de Hg de pression résiduelle) à une température voisine de 35° en présence d'un desséchant (Cl_2Ca, NaOH, 2 parties, 1 partie).

Le résidu sec dissous dans l'eau distillée bouillante est titré en présence de phénolphtaléine par de la soude 0,02 N.

Dans ces conditions il n'y a pratiquement pas de pertes d'acides lors de l'élimination de l'acide Formique.

b) *Acide lactique.* — L'acide formique contenu dans une partie aliquote de la fraction lactique est entraîné à la vapeur d'eau dans l'appareil à acidité volatile JAULMES dans les mêmes conditions que pour le dosage de l'acidité volatile. Il faut recueillir 1 100 cm³ d'eau environ pour éliminer tout l'acide formique. L'acide lactique est alors dosé directement dans le matras par acidimétrie.

Cette technique n'est pas très rigoureuse, elle est de plus, assez peu précise ; nous l'avons cependant adoptée pour sa simplicité car le dosage de l'acide lactique n'était pas l'objet essentiel de notre travail.

Un dosage par oxydation serait plus exact.

Remarques

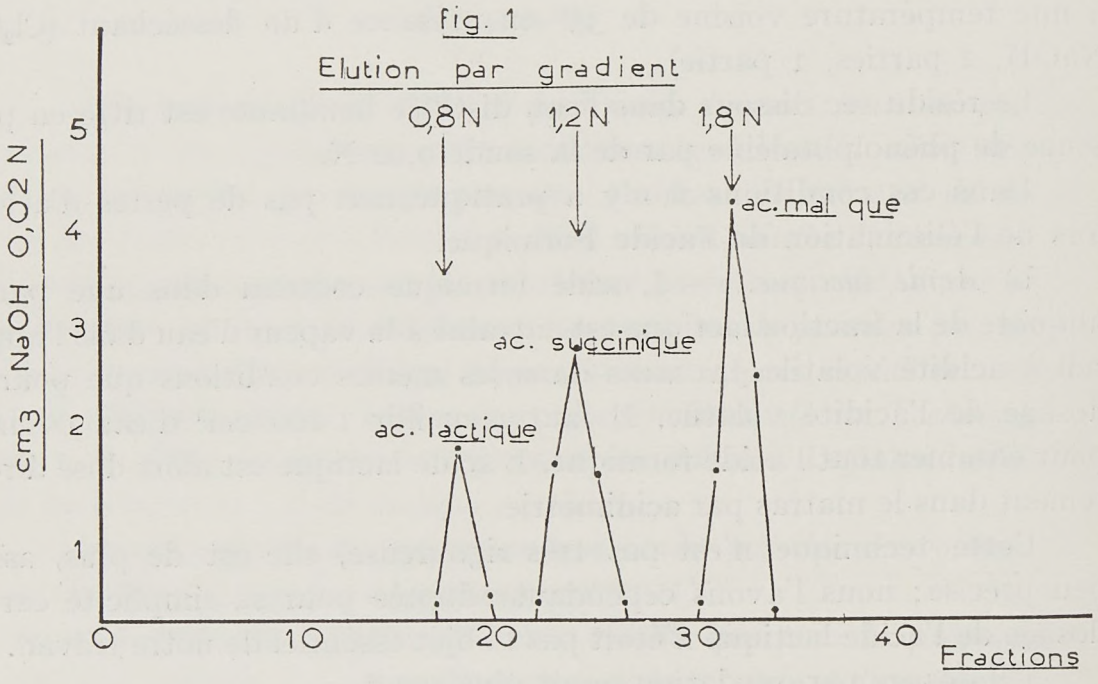
Le dosage par oxydation cérique ou permanganique des acides lactique (6) et malique permettrait également de simplifier considérablement la technique de séparation.

Il suffirait en effet, lors de l'élution, de prélever 2 fractions seulement :
Lactique (du 25e au 60e cm³), fraction I.
Succinique-Malique (du 60e au 210e cm³), fraction II.
Les dosages par oxydation des fractions I et II donneraient les acides lactique et malique.
Le dosage acidimétrique de la fraction II, dans les conditions décrites plus haut donnerait la Somme Acides Succinique et Malique et par différence avec le dosage par oxydation de la fraction II, l'acide Succinique.
Nous nous proposons de voir si une telle modification est possible.

B. — JUSTIFICATION DE LA TECHNIQUE

1. — Choix de l'éluant : Acide Formique 0,75 N

La technique originale de Harris Busch et collaborateurs d'élution par augmentation progressive de la force de l'éluant (0 à 5 N) permet d'éluer les acides lactique, succinique et malique dans de petits volumes d'éluant mais ils passent très rapprochés les uns des autres.



Le diagramme de séparation obtenu avec cette technique (fig. 1) montre des zones d'élution bien symétriques avec des pics aigus mais serrés les uns contre les autres.

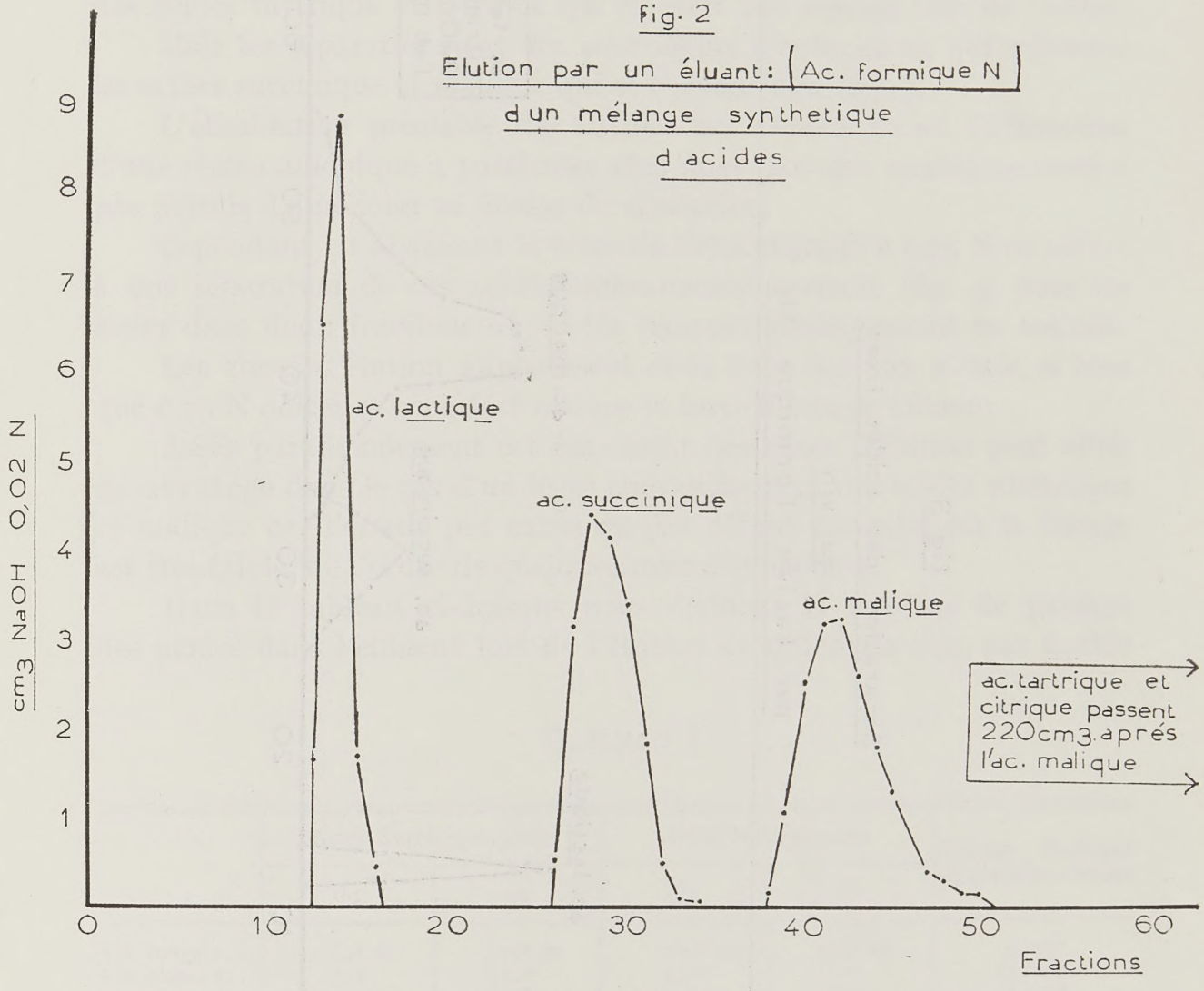
On pouvait tenter d'augmenter l'espace séparant chaque acide soit en modifiant le gradient d'élution (solution peu pratique pour le travail en

série de dosage d'un acide déterminé), soit par le choix d'un éluant de force unique.

A partir des données numériques du mode opératoire de Harris Busch (volume d'éluant 6 N et capacité dn flacon mélangeur, volume mort de la colonne et volume d'eau distillée mis sur la résine avant le départ de l'élution), nous avons calculé approximativement la force de l'éluant utilisé pour le déplacement de chaque acide soit environ 0,8 N-1,2 N et 1,8 N pour, respectivement les acides lactique, succinique et malique.

Fig. 2

Elution par un éluant : (Ac. formique N) d un mélange synthetique d acides



Nous avons donc choisi pour notre éluant une force intermédiaire, 1 N.

Dans ces conditions, comparativement à l'élution selon le gradient 0-2 N de Harris Busch, on pouvait prévoir, avant toute expérimentation une élution plus rapide et aussi symétrique de l'acide lactique séparé de l'acide succinique par un plus grand volume d'éluant, une élution à peu près identique de l'acide succinique avec cependant une zone d'élution moins symétrique à limite arrière légèrement traînante et enfin une élution quelque peu différente de l'acide malique étalée sur un volume beaucoup plus grand d'éluant.

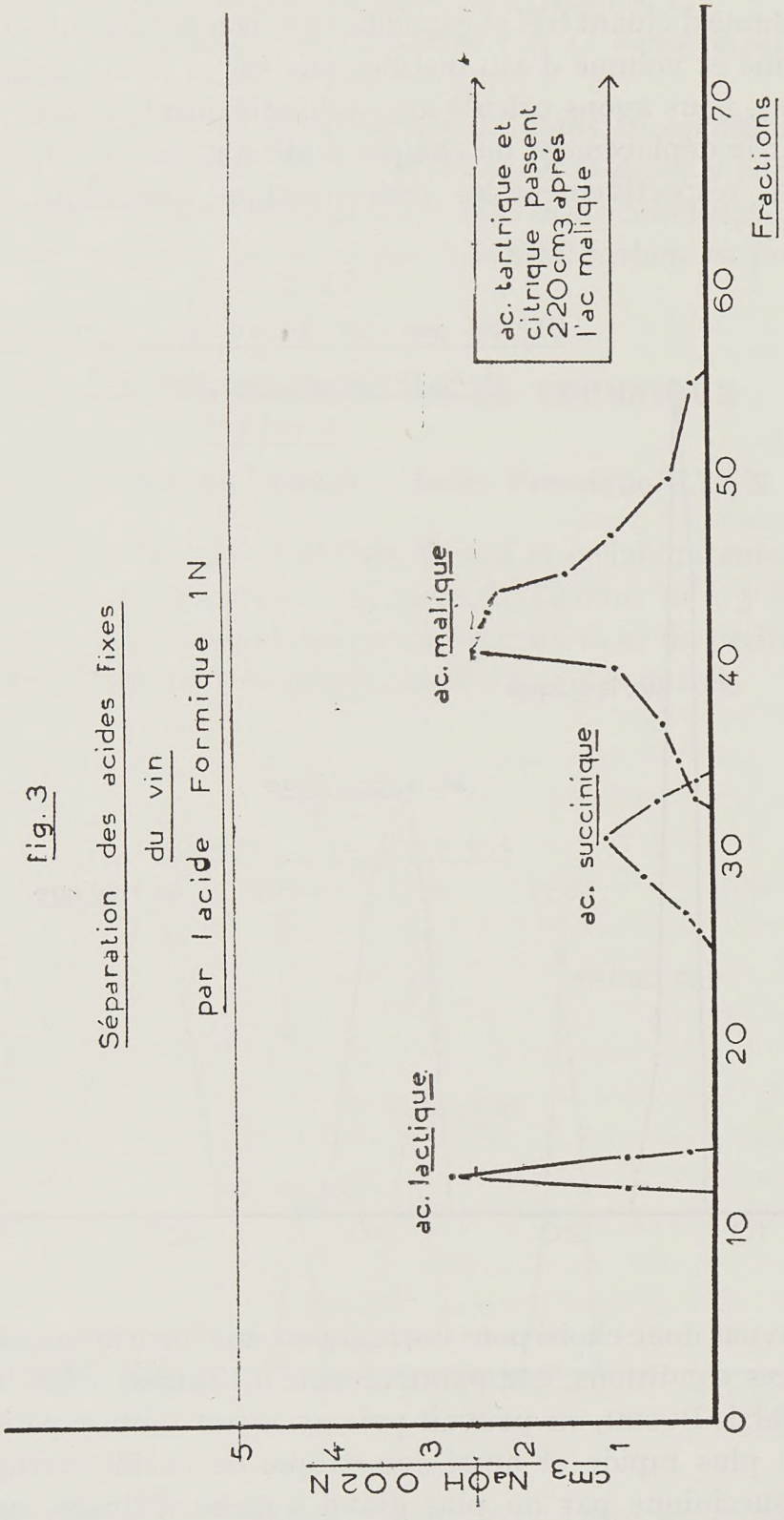


fig. 3

Séparation des acides fixes du vin par l'acide Formique 1N

C'est bien ce que montre le diagramme d'élution d'un mélange synthétique d'acides lactique, succinique, malique, auxquels avaient été ajoutés les acides tartrique et citrique (fig. 2).

Cet éluant permet de très bien isoler l'acide lactique de l'acide succinique qui le suit par 20 cm³ d'effluent environ mais moins bien les acides succinique et malique.

De plus, ce qui est très intéressant pour le dosage de l'acide malique, cet acide est remarquablement bien isolé par plus de 200 cm³ d'effluent des acides tartrique et citrique qui ne sont pas séparés l'un de l'autre.

Mais les séparations sur vin sont moins bonnes en ce qui concerne les acides succinique et malique qui se chevauchent (fig. 3).

L'élimination préalable des cations sur Dowex 50 ou l'utilisation d'une résine anionique à particules plus fines (200-400 meshs) ne nous a pas permis d'améliorer la finesse de résolution.

Cependant en abaissant la force de l'éluant jusqu'à 0,75 N on arrive à une séparation de ces acides suffisamment correcte (fig. 4) pour les isoler dans deux fractions où on les retrouve pratiquement en totalité.

Les zones d'élution s'aplatissent et la base des pics s'étale, si bien que 0,75 N doit être considéré comme la force limite de l'éluant.

Assez paradoxalement cet étalement des zones d'élution peut offrir un avantage dans le cas d'un léger chevauchement des acides succinique et malique car l'erreur par excès ou par défaut commise sur le dosage est très faible, de l'ordre de quelques microéquivalents.

Dans le tableau ci-dessous nous donnons la position de passage des acides dans l'effluent lors de l'élution de différents vins par l'acide

TABLEAU I

	Acide Succinique passe		Acide Malique passe		Volume d'effluent séparant les 2 acides
	du	au	du	au	
Vin rouge 1...	64e cc	111e cc	120e cc	198e cc	9 cm³
Vin blanc 1...	70e	112e	125e	200e	13 cm³
Vin blanc 1...	69e	115e	126e	200e	11 cm³
Vin blanc 2...	69e	116e	123e	200e	7 cm³
Vin blanc 3...	70e	117e	123e	205e	6 cm³
Jus			123e	200e	
	Acide Lactique passe		Volume d'effluent séparant les acides lactique et succinique.		
	du	au			
Vin rouge 1...	35e cc	44e cc	20 cm³		
Vin blanc 3...	30e	46e	26 cm³		

.Le volume d'effluent séparant l'acide malique des acides tartrique et citrique est supérieur à 300 cm³

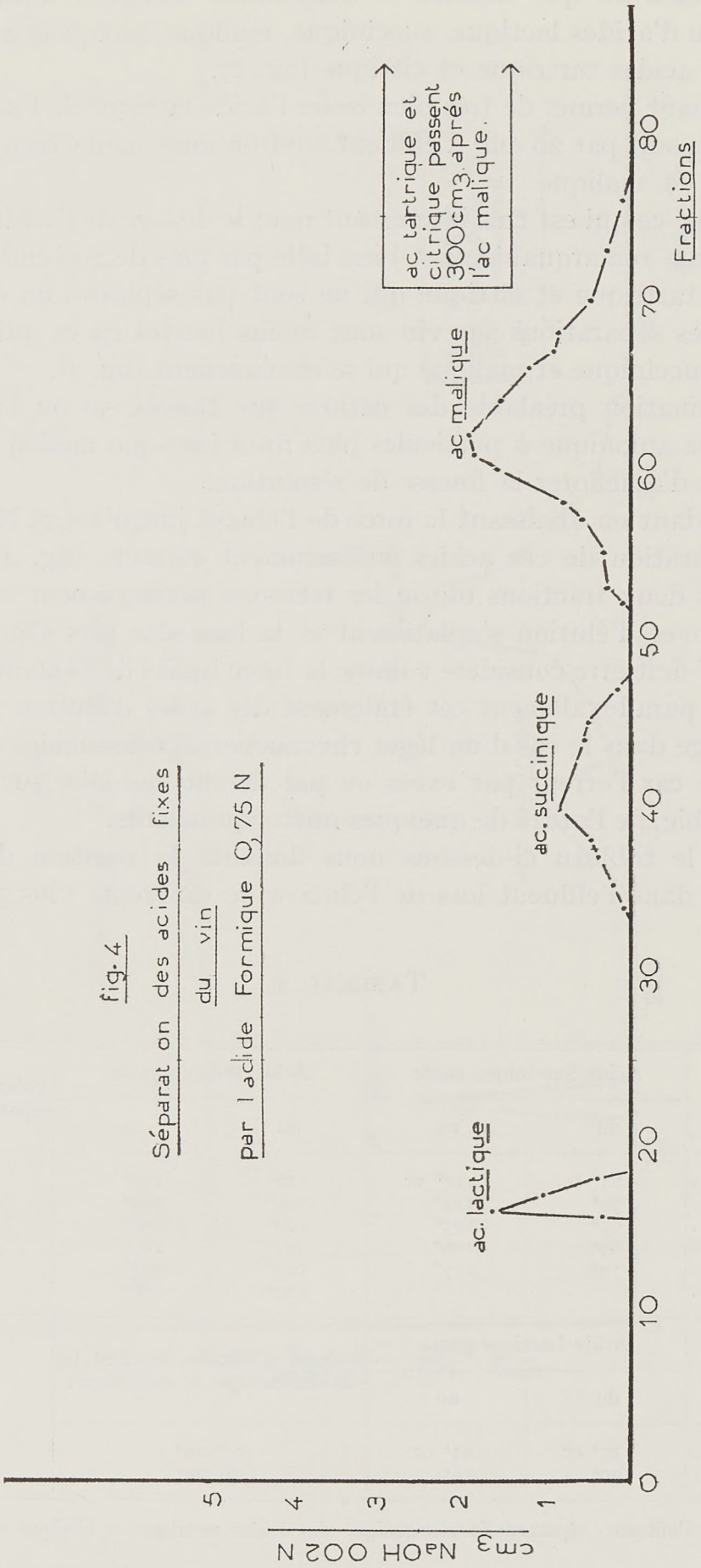


fig. 4

Séparat on des acides fixes du vin par l'acide Formique 0,75 N

formique 0,75 N, ainsi que les volumes d'effluent les séparant. (Séparations effectuées sur six colonnes différentes) (1).

L'acide Formique 0,75 N permet de très bien séparer (*a*) l'acide lactique de l'acide succinique par 25 cm³ d'effluent environ et (*b*) l'acide malique des acides tartrique et citrique par plus de 300 cm³ d'effluent.

Le volume d'effluent séparant les acides succinique et malique est plus faible, 9 cm³ en moyenne, mais supérieur le plus souvent au léger décalage dans les positions de passage de chaque acide que l'on peut observer d'une séparation à l'autre ; ce qui a permis de prévoir un volume de sécurité avant et après chaque acide dans le protocole de séparation :

Acide Lactique : fraction de 25 cm³ entre le 25e et 50e cm³.

Acide Succinique : fraction de 57 cm³ dans un ballon de 75 cm³ entre 60e et 117e cm³.

Acide Malique : fraction de 100 cm³ entre le 117e et 217e cm³.

Dans ces fractions pratiquement la totalité des acides est récupérée.

Cependant, comme nous l'avons déjà précisé plus haut, la pureté de chaque fraction est contrôlée chromatographiquement afin de se mettre à l'abri d'un accident de fractionnement qui pourrait éventuellement se produire.

Signalons en effet qu'après un certain nombre d'utilisations (25 à 30 environ) les colonnes perdent une partie de leur pouvoir de résolution, peut être par adsorption de colloïdes éliminés imparfaitement lors de la régénération ; la matière colorante également n'est pas éluée en totalité. Les vins d'hybrides et vinifera rouges et blancs testés ont cependant donné les mêmes diagrammes d'élution.

Enfin un dernier point à souligner : lorsqu'un lot de résine étant épuisé on passe à un autre, il est nécessaire de le tester aussi car on peut observer un léger décalage dans la position de passage de chaque acide, comme le montrent les résultats moyens de séparations effectuées sur les mêmes vins avec deux lots de résine.

TABLEAU II

	Acide Lactique passe		Acide Succinique		Acide Malique passe	
	du	au	du	au	du	au
Lot 1	32 e cc	45e cc	68e cc	114e cc	123e cc	200e cc
Lot 2	35 e	42e	85e	110e	120e	185e

Mais pratiquement le protocole expérimental de récupération des acides est peu modifié.

(1) L'acidité de chaque fraction était titrée après évaporation sous vide à 35° pour éviter toute perte d'acides et ceux-ci identifiés chromatographiquement après concentration maxima.

Comme nous l'avons déjà dit, la solution la plus élégante pour mettre la méthode à l'abri des imperfections inhérentes aux techniques chromatographiques serait le dosage des acides lactique et malique par oxydation qui permettrait (*a*) de la simplifier (une seule fraction de 150 cm³ à prélever entre le 60e et le 210e cm³ pour le dosage Acide Succinique + Acide Malique) (*b*) de la rendre plus sûre encore puisqu'il n'y aurait plus lieu de craindre le chevauchement des acides succinique et malique et (*c*) de la rendre également plus rapide puisqu'il serait alors possible d'adopter vraisemblablement un éluant de force plus élevée 1 N ou peut-être 1,5 N.

2. — **Résultats obtenus**

a) Dosage sur moûts et vins.

Tableau III

	Acide Lactique m-eq/l. (Fraction 25e à 50e cc recueillie dans un flacon de 25 cm³).		Acide Succinique m-eq/l. (Fraction 60e à 117e cc recueillie dans un flacon de 75 cm³).		Acide Malique m-eq/l. (Fraction 117e à 217e cc recueillie dans un flacon de 110 cm³) Pour les moûts 110-210).	
Vin n° 1						
Colonne 1.....	8,27	moyenne	12,15	moyenne	37,28	moyenne
Colonne 2.....	9,32	8,8	12,53	12,37	36,46	
Colonne 3.....			12,45		36,64	36,80
Colonne 4.....					36,84	
Vin n° 2						
Colonne 1.....	11,7	moyenne	19,14	moyenne	22,08	moyenne
Colonne 2.....	12,4	12,1	19,06		21,21	
Colonne 3.....	12,2		19,38	19,16	21,96	21,88
Colonne 4.....			19,06		22,28	
Moût n° 1						
Colonne 1.....					62,25	moyenne
Colonne 2.....					61,50	61,87
Moût n° 2						
Colonne 3.....					85,09	moyenne
Colonne 4.....					84,85	84,97

Voici quelques autres résultats de dosage de l'acide malique effectués en double sur deux colonnes différentes :

	Aramon 1 (moût)	Aramon 2 (moût)	Cinsault (moût)	Carignan (moût)	Vin
Acide malique	78,4	113,2	50,7	85,5	55
m-eq/l.	78,4	113,7	50,1	85	55,2

Les écarts entre les dosages n'excèdent pas 1 m-eq pour l'acide lactique et 0,5 à 1,0 m-eq pour les acides succinique et malique.

b) Dosages sur vins et moûts dilués.

Les vins et moûts de l'expérience précédente ont été réanalysés après dilution : (facteur de dilution pour les vins 0,8 et pour les moûts 0,3).

Les teneurs théoriques en acides des différents échantillons ont été calculées à partir de la moyenne des résultats précédents, que nous avons admises comme teneurs réelles, et comparées aux teneurs dosées.

TABLEAU IV

	Acide Succinique m-eq/l.		Acide malique m-eq/l.		Acide lactique m-eq/l.	
	Théorique	Dosé	Théorique	Dosé	Théorique	Dosé
Vin n° 1	*9.89*	10,0 9,62 *moyenne* *9,81*	*29,44*	28,67 29,13 *moyenne* 28,90	*7*	4,4 5,6 *moyenne* *5*
Vin n° 2	*15,30*	14,41 14,80 *moyenne* *14,60*	*17,50*	16,98	*9,68*	8,0 6,8 *moyenne* 7,4
Moût n° 1			*18,56*	18,84 18,59 *moyenne* 18,71		
Moût n° 2			*25,49*	25,52 25,92 *moyenne* *25,72*		

Les acides succinique et malique sont récupérés à quelques dixièmes de m-eq. près, l'acide lactique à 2 m-eq. près.

Les écarts entre deux dosages sont du même ordre que dans l'expérience précédente.

RÉSUMÉ

Une méthode de séparation par chromatographie d'échange d'ions sur Dowex 1 × 8 100-200 meshs ($HCOO^-$) et de dosage des acides lactique succinique et malique est décrite.

Les acides sont élués par l'acide Formique 0,75 N qui permet de les isoler suffisamment pour les recueillir dans 3 fractions que l'on dose par acidimétrie après élimination du solvant.

Dans ces conditions l'acide lactique est dosé à environ 2 m-eq. près et les acides succinique et malique à 0,5-1,0 m-eq, près.

Une simplification de la technique par dosage par oxydation permanganique ou cérique est en cours qui devrait permettre de la rendre également plus rapide et plus sûre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) CORDONNIER (R.) et BIZEAU (C.). — *Ann. Techno.*, I, p. 69-79, 1959.
(2) ROSSET (R.) et DUPUY (P.). — *Ann. Techno.*, IV, p. 441- 1958.
(3) PEYNAUD. — *Ann. Fals. Fraude*, p. 332, 1938.
(4) BUSCH (H.), HURLBERT (R.) et VON POTTER. — *J. Biol. Chem.*, **196**, 717, 1952.
(5) GOODBAN et STARK. — *Anal. Chem.*, **29**, 283, 1957.
(6) KOURAKOU DIMOTAKI (Mme V.). — *Ann. Fals. Expert. Chim.*, 1960, sous presse.

Reçu pour publication le 30 août 1960.

ASSOCIATION DES PROTEINES ET DE DIFFÉRENTES FORMES DU PHOSPHORE DANS LE GLUTEN

PAR

A. BOURDET et J. HERARD

Laboratoire d'Étude et de Contrôle de la Qualité des Blés français, Paris.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction

I. — Conditions expérimentales

A. — Extraction et dosage des lipides des farines.
B. — Fractionnement du gluten.
1. Constituants lipidiques.
2. Constituants solubles dans l'acide perchlorique à froid.
3. Constituants solubles dans l'acide perchlorique à chaud.
C. — Méthodes analytiques.

II. — Résultats obtenus et discussion

A. — Étude comparée de la composition lipidique des farines et de leur gluten.
B. — Nature et importance respective des fractions phosphorées du gluten.
C. — Association des Protéines et des différentes formes du phosphore.

III. — Conclusions

IV. — Bibliographie

INTRODUCTION

Constituant protéique fondamental des farines, le gluten conditionne pour une large part leur qualité technologique. Sous ce double aspect, il a fait l'objet de très nombreux travaux visant à préciser les

caractéristiques physico-chimiques des protéines dont il est formé et leur incidence sur les propriétés des farines (4).

En dépit de son caractère protéique prédominant, il n'en reste pas moins que ce corps ferme et élastique, que l'on peut extraire de la farine de blé, représente une association complexe où les constituants de nature non protéique forment entre 15 et 25 p. 100 de sa substance sèche.

Parmi ces derniers, les lipides occupent pondéralement la première place puisque leur proportion dans le gluten sec varie, selon les cas, de 5 à 12 p. 100 et représente 50 à 80 p. 100 des lipides initialement présents dans la farine.

Ces lipides appartiennent à deux catégories distinctes : des lipides simples, type glycérides, très voisins de ceux des huiles végétales ou de certaines graisses animales, des lipides complexes où prédominent les phospholipides. Ceux-ci sont actuellement les constituants phosphorés du gluten et des farines les mieux connus.

Aisément extractibles de la farine par des solvants tels que l'éther sulfurique, l'éther de pétrole ou le tétrachlorure, il faut l'intervention plus énergique de l'éthanol à l'ébullition pour les isoler du gluten. Olcott et Mecham (25) ont en effet mis en évidence le fait que les phospholipides s'associent au gluten lors de la transformation des farines en pâte. Mecham et Weinstein (21) ont montré par ailleurs que le chlorure de sodium diminue de façon notable la liaison des phospholipides dans la pâte et que, plus généralement, l'extraction du gluten par des solutions salines a pour effet d'abaisser sa teneur en phophore lipidique.

Le gluten se présente donc sous cet angle comme un complexe lipido-protéique assez voisin de certains autres systèmes naturels tels que ceux présents par exemple dans le sang ou le jaune d'œuf (22).

L'opinion la plus répandue considère en effet que dans le gluten, protéines et lipides (et plus particulièrement les phospholipides) sont étroitement associés. Les théories sur la nature de cette association demeurent assez diverses, mais toutes s'accordent néanmoins pour attribuer aux phospholipides un rôle important dans la détermination des caractéristiques technologiques des farines et des pâtes.

Olcott et Mecham (25) considèrent que les protéines du type gluténine, formant la fraction la moins soluble du gluten, seraient plus particulièrement responsables de la liaison des lipides et que les phospholipides seraient intimement associés à cette fraction.

Une étude physique de la farine et des pâtes conduit Hess (17) à distinguer deux types protéiques : les protéines adhérentes à l'amidon formant un réseau à structure fibreuse, et les protéines interstitielles sans structure définie ; une couche de lipides neutres séparerait ces deux types protéiques, tandis que les phospholipides seraient plus particulièrement associés aux protéines adhérentes.

Bunjenberg de Jong (7) voit dans la structure même des phospholipides une possibilité d'association entre les protéines, substances hydrophiles et les lipides simples, substances hydrophobes : l'extrémité hydrophile de la molécule de lécithine (choline et acide phosphorique) serait fixée sur les protéines alors que la partie hydrophobe, constituée par le glycérol et les acides gras, serait fixée aux lipides simples.

Participant étroitement à la formation du complexe lipido-protéique du gluten, les phospholipides ne constituent toutefois qu'une fraction de son phosphore total.

Des auteurs ont récemment déterminé la teneur en phosphore total des glutens en provenance de 40 échantillons de blé Hard Red Winter, parallèlement à la teneur en gluten, sans qu'apparaisse d'ailleurs de corrélation significative entre ces deux déterminations (2).

Nous avons de notre côté précisé la nature et les proportions des différentes formes de phosphore présentes dans le grain de blé (5), mais en ce qui concerne le gluten lui-même, nos connaissances dans ce domaine demeurent limitées si l'on excepte le phosphore lipidique.

C'est à Guillemet et coll (16) que semble revenir le première tentative de fractionnement et de dosage des constituants phosphorés du gluten et de ses fractions solubles et insolubles dans l'éthanol 70 p. 100. Un bilan provisoire rendait compte des proportions respectives du phosphore lipidique extrait à l'éther, puis à l'éthanol, du phosphore extractible en milieu trichloracétique et du phosphore résiduel.

Un autre type de fractionnement faisant intervenir une dispersion du gluten dans le salicylate et des précipitations par le sulfate de magnésium a permis plus récemment à Neufeld et Mecham (23) d'isoler diverses fractions protéiques contenant du phosphore non lipidique, phosphore dont la nature n'a pu être précisée. Une hypothèse a été néanmoins avancée selon laquelle il existerait peut-être une relation entre les constituants nucléiques des farines et les propriétés d'absorption d'eau des pâtes.

Il ressort des divers travaux précédemment cités que certains constituants phosphorés du gluten, bien que quantitativement mineurs, seraient susceptibles d'intervenir dans la détermination des caractéristiques technologiques des farines, dont le gluten constitue un des éléments fondamentaux.

Avant d'aborder l'aspect purement technologique du problème, il nous est donc apparu utile de déterminer dans quelles proportions protéines, lipides et phospholipides sont associés dans les farines et dans les glutens qui en sont extraits, et d'essayer parallèlement de préciser la nature et l'importance des diverses formes du phosphore présentes dans le gluten.

L'étude que nous présentons ici visait donc à établir :

— dans quelle mesure les proportions respectives des protéines, des lipides et des phospholipides dans les farines et les glutens correspondants peuvent caractériser une farine donnée.

— si les différentes formes du phosphore présentes dans le gluten sont toujours associées aux protéines dans des rapports constants ou, au contraire, variables selon les farines.

I. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Sur les 10 farines dont nous avons extrait les glutens faisant l'objet de cette étude, huit (de A à H) ont été obtenues par mouture expérimentale de variétés françaises de blés tendres en provenance de diverses stations agronomiques de l'I. N. R. A. Les deux autres farines (désignées par I et J) résultent de moutures industrielles, également de blés tendres.

Les divers échantillons ont été choisis de façon à constituer, du point de vue force boulangère, une gamme suffisamment étendue.

Les glutens ont été préparés selon la technique courante de lixiviation à l'eau, divisés à l'état humide en petits fragments, cryodesséchés, puis finement réduits par broyage avant d'être analysés. Les échantillons ainsi obtenus présentaient une teneur en eau comprise entre 3 et 7 p. 100.

A — Extraction et dosage des lipides des farines.

Un premier traitement des farines par l'éther sulfurique au Kumagawa permet de déterminer leur teneur en lipides libres. Après refroidissement, l'extrait est filtré dans un ballon taré et le résidu lipidique pesé après évaporation du solvant.

La reprise de ce résidu par l'acétone à température ordinaire permet de déterminer quantitativement les lipides solubles (type glycérides), et, par différence, les lipides complexes insolubles (type phospholipides).

Dans un second stade, le résidu de farine délipidé par l'éther sulfurique est épuisé au Kumagawa par l'éthanol pendant huit heures. En même temps qu'il dissocie les complexes lipidoprotéiques, ce traitement à l'éthanol solubilise la majeure partie des sucres libres de la farine ainsi qu'une fraction non négligeable de ses constituants protéiques, plus particulièrement ceux du type gliadine.

La détermination quantitative de la fraction des lipides de la farine fortement fixés aux protéines (lipides liés) nécessite donc une reprise de l'extrait alcoolique par un solvant capable de solubiliser spécifiquement les lipides présents, tout en insolubilisant les constituants de nature glucidique et protéique.

Le chloroforme anhydre permet cette séparation des lipides liés. L'extrait alcoolique, préalablement évaporé, est repris par le chloroforme ; les extraits chloroformiques sont filtrés, recueillis dans un vase taré et le résidu lipidique pesé après élimination du solvant.

B — Fractionnement du gluten.

La méthode de fractionnement mise en œuvre comporte schématiquement trois opérations successives :

1° Traitement du gluten par des solvants organiques permettant l'extraction et l'isolement sélectif de ses divers constituants lipidiques.

2° Extraction du gluten délipidé par l'acide perchlorique à froid.

3° Épuisement du résidu protéique par l'acide perchlorique à chaud.

Ces diverses opérations sont effectuées directement dans un même tube centrifugeur de 30 cm^3 à partir d'une prise de 2 gr. (substance sèche), la centrifugation permettant de séparer quantitativement par siphonnage les différents extraits du résidu insoluble.

Ces extraits sont à leur tour soumis à plusieurs traitements complémentaires en vue d'en déterminer quantitativement les divers composants et, le cas échéant, d'en préciser la nature.

Nous avons schématisé dans la Figure I l'ensemble des opérations de fractionnement des constituants phosphorés du gluten. En voici d'autre part la description détaillée.

1° Extraction, fractionnement et dosage des constituants lipidiques.

— La fraction lipidique du gluten non liée aux protéines (lipides libres) est extraite en soumettant l'échantillon à 4 extractions successives par l'éther sulfurique à la température du laboratoire. Les extraits recueillis après filtration dans un ballon taré sont évaporés puis pesés.

Dans le cas des glutens, l'extraction par l'éther sulfurique à température ordinaire a été jugée préférable à une extraction à l'ébullition. Même en prenant soin de n'effectuer la filtration qu'après refroidissement, les extraits par l'éther chaud abandonnent toujours une fois évaporés un léger dépôt blanc venant fausser la détermination pondérale des lipides.

On a également vérifié que, toutes conditions égales, l'éther sulfurique solubilise une quantité de lipides plus élevée que l'éther de pétrole.

— Comme pour les farines, la fraction des lipides fortement fixés aux protéines (lipides liés) est obtenue ensuite en soumettant le résidu de gluten à 3 extractions consécutives par l'éthanol à l'ébullition.

Les extraits éthanol évaporés sont à leur tour repris par le chloroforme anhydre. On filtre et pèse le résidu lipidique après élimination du solvant.

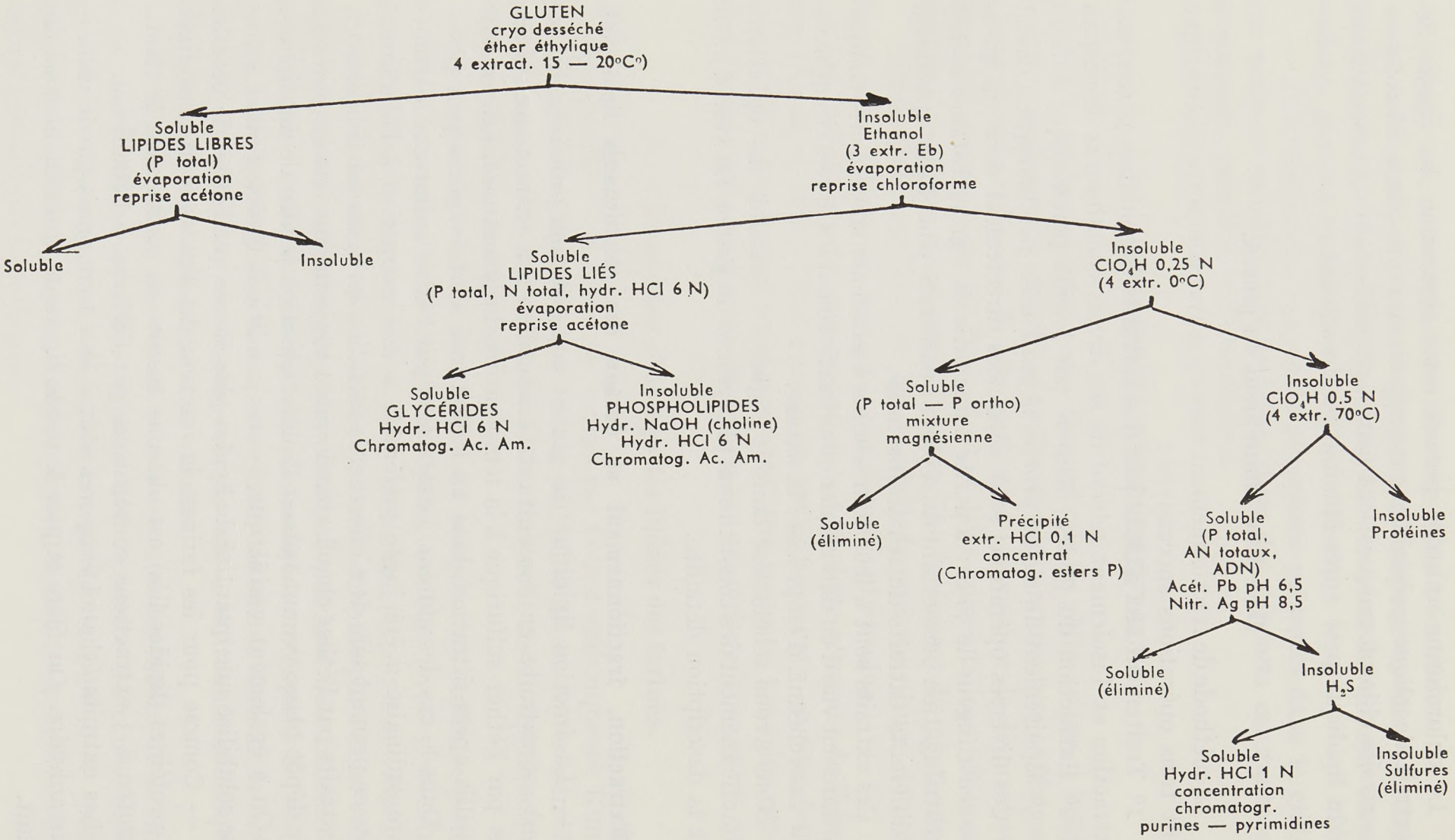


FIG. 1. — *SCHÉMA DE FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS DU GLUTEN.*

Ces opérations pratiquées en double sur chaque échantillon de gluten, ont permis d'établir l'importance pondérale respective des deux fractions lipidiques ainsi obtenues.

Sur chacune d'elles, diverses déterminations complémentaires ont été réalisées :

a) Fraction extraite par l'éther sulfurique (lipides libres) :

— dosage du phosphore total ;

— détermination respective des fractions soluble et insoluble dans l'acétone.

b) Fraction extraite par l'éthanol et soluble dans le chloroforme (lipides liés) :

— dosage du phosphore total et de l'azote total ;

— hydrolyse en tube scellé (20 heures dans HCl 6N) ; après élimination des substances humiques formées, l'hydrolysat est soumis à la chromatographie bidimensionnelle sur papier en vue d'identifier les acides aminés éventuellement présents ;

— un traitement par l'acétone permet d'autre part de déterminer l'importance pondérale des fractions soluble et insoluble dans ce solvant.

Chaque fraction est hydrolysée par voie chlorhydrique dans les mêmes conditions que précédemment. L'hydrolysat est analysé par chromatographie sur papier en vue de la recherche des acides aminés et des sucres.

Enfin, sur une partie aliquote de la fraction insoluble dans l'acétone soumise à une hydrolyse alcaline, on a procédé à la recherche qualitative de la choline par l'intermédiaire des cristaux caractéristiques qu'elle forme avec l'iode (cristaux de Florence).

2° Extraction, fractionnement et dosage des constituants solubles dans l'acide perchlorique à froid

Le résidu de gluten délipidé est traité 4 fois consécutives par ClO_4H 0,25N à une température voisine de 0°C. Les extraits perchloriques sont rassemblés après centifugation et amenés à un volume connu (50 ml).

Sur des fractions aliquotes, on dose le phosphore minéral (P ortho) et le phosphore total (P total). Le traitement des extraits perchloriques par HCl 1N (7 minutes à 100°C), ne modifie pas leur teneur en P ortho. On détermine la teneur des extraits en P organique par la différence P total — Portho.

Une autre fraction des extraits perchloriques est alcalinisée par l'am-

moniaque puis additionnée, volume à volume, de mixture magnésienne (nitrate Mg 0,5M-nitrate NH_4 2M-NH_4OH 2M).

Après repos 24 h. au froid, le précipité formé est séparé par centrifugation, lavé par NH_4OH 2 p. 100 puis extrait par HCl 0,1N. La solution chlorhydrique ainsi obtenue est soumise, après concentration sous vide, à la chromatographie sur papier pour identifier les phosphates minéraux et organiques.

3° Extraction, fractionnement et dosage des constituants solubles dans l'acide perchlorique à chaud

Le matériel insoluble qui résulte des opérations précédentes est soumis 4 fois consécutives à l'action de ClO_4H 0,5 N à 70°C, les extraits obtenus étant rassemblés et amenés à un volume connu (50ml).

On sait que, dans ces conditions de température et de concentration, l'acide perchlorique solubilise les constituants de nature nucléique mais non les protéines. L'acide trichloracétique utilisé à 90° C et à la concentration de 5 p. 100 se comporte de la même façon, mais a par contre le désavantage de présenter dans la région ultraviolette du spectre une absorption interférant avec celle des composés nucléiques.

Dans un travail récent, effectué sur le blé (5), la haute teneur en amidon du matériel végétal analysé nous avait interdit l'emploi de l'acide perchlorique et seul l'acide trichloracétique, malgré l'incon vénient signalé, nous avait permis une extraction satisfaisante des composés nucléiques.

Dans le cas présent, où le matériel à étudier est de nature essentiellement protéique et très pauvre en amidon, l'emploi préférentiel de l'acide perchlorique se trouve donc pleinement justifié.

Dans des essais préliminaires, nous avons tenté d'appliquer au gluten débarrassé de ses constituants lipidiques et acido-solubles, la technique de fractionnement préconisée par SCHMIDT et THANNAUSER, faisant intervenir une solubilisation des protéines par traitement alcalin, suivie de leur reprécipitation en milieu acide, permettant l'isolement spécifique des 2 types d'acides nucléiques. Mais un tel fractionnement n'a pas conduit à des résultats significatifs par suite de la richesse en protéines du matériel étudié.

Sur des parties aliquotes des extraits perchloriques on a dosé parallèlement le phosphore total, les acides nucléiques totaux et l'acide désoxyribonucléique.

a) DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES TOTAUX :

La densité optique des extraits perchloriques, convenablement dilués par HCl 0,1 N, est mesurée en cuves de quartz au Spectrophotomètre Unicam à 260-265 mμ, par rapport à un blanc.

Les densités optiques obtenues sont transformées en valeurs d'acides nucléiques en les rapportant à une courbe étalon. Cette courbe exprime la moyenne des coefficients d'extinction établis dans les mêmes conditions expérimentales, respectivement à partir de concentrations connues d'acide désoxyribonucléique (thymus)et ribonucléique (levure).

Les valeurs d'acides nucléiques ainsi obtenues peuvent être transformées en phosphore nucléique sur la base d'une teneur moyenne en phosphore de 9,7 p. 100.

b) Dosage de l'acide désoxyribonucléique (A D N).

Comme dans l'étude antérieure sur le blé (5), nous avons utilisé la microméthode à l'indole proposée par Ceriotti. Travaillant cette fois sur des extraits perchloriques, les densités optiques mesurées à 490 mμ ont été rapportées à une courbe étalon établie dans les mêmes conditions.

Cette courbe s'est révélée identique à celle obtenue antérieurement à partir d'extraits trichloracétiques et il ne semble pas, contrairement à ce qu'à signalé Ceriotti, que la sensibilité de la réaction soit accrue en milieu perchlorique.

D'un point de vue uniquement qualitatif, nous avons également appliqué aux extraits perchloriques de gluten la réaction de Dische à la diphénylamine, telle qu'elle a été récemment modifiée par Burton (8), qui opère en présence d'acétaldéhyde et à 30°C. La coloration bleue obtenue, spécifique du désoxyribose, présente une absorption maxima à 600 mμ.

c) Estimation de l'acide ribonucléique (A R N)

Nous avons tenté de déterminer quantitativement l'ARN en appliquant aux extraits perchloriques la réaction des pentoses à l'orcine de Bial. Mais, même en tenant compte de la coloration fournie par le désoxyribose, les valeurs d'ARN ainsi obtenues étaient anormalement élevées et sans rapport avec les teneurs en acides nucléiques totaux déterminées par absorption ultraviolette. L'excès de pentoses de nature non nucléique interdit donc l'emploi de la réaction de Bial pour le dosage de l'ARN.

En conséquence, l'ARN éventuellement présent dans les extraits perchloriques a été estimé par différence entre les valeurs d'acides nucléiques totaux (UV) et celles d'ADN (indole).

Les teneurs en ADN et ARN ainsi établies ont été transformées en valeurs de phosphore correspondantes sur la base d'une teneur respective de 9,6 et 9,8 p. 100.

d) Fractionnement complémentaire des extraits perchloriques :

Outre les déterminations quantitatives précédentes, les extraits perchloriques de glutens ont été soumis à diverses opérations ayant pour but de préciser leur composition qualitative.

Dans une première série d'opérations, les extraits perchloriques sont alcalinisés par l'ammoniaque à pH 8,5 et additionnés de nitrate d'argent. Un repos au froid favorise la formation d'un précipité qui est séparé par centrifugation. On déplace ensuite l'argent du précipité par un traitement de 10 minutes au bain -marie bouillant par HCl 0,1N.

Une partie aliquote de l'extrait obtenu est chromatographiée, après hydrolyse d'une heure à 100°C par HCl 1N, en vue d'identifier les constituants puriques et pyrimidiques éventuellement libérés.

Une autre partie aliquote est soumise à une hydrolyse poussée (20h. à 120°C par HCl 6N en tube scellé) et l'hydrolysat soumis à la chromatographie sur papier pour la recherche des acides animés.

Pour des raisons exposés plus loin, les extraits perchloriques ont été d'autre part soumis à une série de fractionnements mettant en œuvre successivement les sels de plomb et d'argent.

L'extrait est d'abord amené à pH 6,5 par l'ammoniaque, puis additionné d'acétate de plomb. On recueille le précipité formé (Pb, pH 6,5). On obtient un deuxième précipité (Ag, pH 8,5) en alcalinisant à pH 8,5 la fraction soluble recueillie après centifugation et additionnée de nitrate d'argent.

Les deux précipités ainsi séparés et remis en suspension dans l'eau sont traités individuellement par un courant d'H_2S. On sépare ensuite les sulfures insolubles. Les extraits obtenus sont alors chromatographiés, après hydrolyse d'une heure dans HCl 1N et concentration sous vide, pour identifier les composés puriques et pyrimidiques libérés.

Le phosphore a été dosé soit directement (P ortho) soit après minéralisation nitrique (P total) selon la méthode de Macheboeuf-Delsal déjà utilisée.

C — Méthodes analytiques.

L'azote total a été déterminé selon Kjeldahl.

Chromatographie sur papier : Les systèmes solvants ont été choisis en fonction de la nature des produits à séparer ; selon les cas, on a pratiqué la chromatographie à une ou deux dimensions. Tous les essais ont été effectués sur papier Whatman n° 1.

Phosphates et esters-phosphates : L'un ou l'autre des deux systèmes suivants a été utilisé en une dimension :

— n-butanol (40) n-propanol (20) acétone (25) acide formique 80 p. 100 (25) acide trichloracétique 30 p. 100 (15), (14) écoulement descendant 24 heures à 20°C.

— méthanol (70) NH_4O4 0,5N (30) (1) écoulement descendant 48 heures à 20°C.

Les taches sont révélées par pulvérisations successives de $FeCl_3$ 0,1 p. 100 puis d'acide sulfosalycilique 7 p. 100 dans l'éthanol 7,5 p. 100 (28). Elles apparaissent en blanc sur fond mauve pâle.

Acides aminés (chromatographie bidimensionnelle)

1 — méthyléthylcétone (60) acétone (20) eau (20) acide formique (2) (18) 15 heures (descendant).

2 — méthanol (80) eau (20) pyridine (4) (26) 15 h. (descendant).

Les taches sont révélées par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,5 p. 100 dans l'éthanol.

Sucres : (chromatographie unidimensionnelle)

— acétate d'éthyle (8) pyridine (2) eau (1) — 24 h. (descendant).

La révélation des taches est faite à 115°C après pulvérisation d'oxalate d'aniline.

Dérivés puriques et pyrimidiques (chromatographie unidimensionnelle).

— butanol tertiaire (80) HCl 6N (20)

Les produits séparés sont mis en évidence par photographie des chromatogrammes en lumière ultraviolette.

L'identification de certains constituants a été complétée par détermination, au spectrophotomètre Unicam, de leur absorption dans l'ultra-violet, aux longueurs d'ondes caractéristiques, sur des éluats dans HCl 0,1N des taches découpées.

II — RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

A — Étude comparée de la composition lipidique des farines et de leurs glutens.

Dans le tableau I suivant,nous avons rassemblé les résultats concernant la composition lipidique de 7 farines, parallèllement à celle des glutens qui en ont été extraits. Les teneurs correspondantes en protides sont également indiquées.

Ces résultats intéressent les fractions extractibles respectivement par l'éther sulfurique (lipides libres), par l'éthanol après reprise par le chloroforme (lipides liés) ; les lipides totaux sont représentés par la somme de ces 2 fractions.

Les phospholipides correspondent à l'insoluble dans l'acétone obtenu, soit à partir de l'extrait éthéré dans le cas des farines, soit à partir de la

TABLEAU I

	Farines							Glutens						
	A	B	D	E	F	G	H	A	B	D	E	F	G	H
								p. 100 de substance sèche						
Protides totaux (N × 5,7)..	12,2	11,5	10,3	9,4	10,4	10,2	11,7	77,8	80,6	85,3	75,1	83,4	75,0	78,3
Lipides totaux	2,07	2,10	1,56	1,55	1,73	1,81	1,80	8,40	8,20	6,90	9,00	8,00	8,45	8,90
Lipides libres	1,79	1,74	1,33	1,29	1,41	1,46	1,57	2,45	2,55	1,80	2,25	2,80	2,05	2,75
Lipides liés	0,28	0,36	0,23	0,26	0,32	0,35	0,23	5,95	5,65	5,10	6,75	5,20	6,40	6,15
Phospholipides	0,31	0,32	0,24	0,20	0,25	0,26	0,32	2,13	2,38	2,47	2,40	2,65	2,76	2,49
								p. 100 des Protides						
Lipides libres	14,7	15,1	13,0	13,8	13,5	14,3	13,4	3,1	3,1	2,1	3,0	3,3	2,7	3,5
Lipides liés	2,3	3,1	2,2	2,7	3,0	3,4	2,0	7,7	7,0	5,9	8,9	6,2	8,5	7,8
Phospholipides	2,5	2,8	2,3	2,1	2,4	2,5	2,7	2,7	2,9	2,9	3,1	3,1	3,6	3,1
								p. 100 des Lipides totaux						
Lipides libres	86	83	84,1	82,7	80,5	80,6	87,2	29,2	31	26,1	25	35	24,3	31
Lipides liés	14	17	15,9	17,3	19,5	19,4	12,8	70,8	69	73,9	75	65	75,7	69
Lipides liés/Lipides libre	0,15	0,20	0,17	0,20	0,22	0,24	0,14	2,43	2,22	2,83	3,03	1,84	3,13	2,20
% des : Lipides libres / hospholipides	17,3	18,3	18	15,5	17,7	17,8	20	—	—	—	—	—	—	—
% des : Lipides liés .	—	—	—	—	—	—	—	35,8	42,1	48,4	35,5	51	43,1	40,5
Coefficient de fixation								5	4	4,6	4,3	3,3	3,9	5,4

fraction extraite par l'éthanol et soluble dans le chloroforme dans le cas des glutens.

Les résultats sont exprimés soit en p. 100 de substance sèche, soit en p. 100 des Protides, ce qui, dans ce dernier cas, permet une comparaison plus aisée de la composition lipido-protéique de 2 matériels aussi dissemblables que les farines et leurs glutens.

Nous avons également déterminé la valeur du rapport Lipides liés/Lipides libres et établi les proportions de chacune de ces fractions par rapport aux Lipides totaux. Quant aux phospholipides, ils ont été exprimés soit en p. 100 des lipides libres dans le cas des farines, soit en p. 100 des lipides liés dans le cas des glutens.

Enfin, pour rendre compte des modifications de l'état de liaison des lipides intervenant au cours de l'extraction du gluten après transformation de la farine en pâte, nous avons défini un *coefficient de fixation* égal au rapport Lipides liés du Gluten/Lipides liés de la Farine dont chaque terme est exprimé en p. 100 des Lipides totaux dosés dans les substrats correspondants.

Un examen comparé des résultats relatifs aux teneurs en lipides libres, liés et phospholipides révèle certaines différences de composition.

Les teneurs des farines en lipides libres oscillent entre 1,29 et 1,79, celles en lipides liés entre 0,23 et 0,36, et pour les phospholipides entre 0,20 et 0,32.

Dans le cas des glutens, les fractions correspondantes représentent, en p. 100 de substance sèche, de 1,80 à 2,80 (lipides libres) de 5,10 à 6,75 (lipides liés) de 2,13 à 2,76 (phospholipides).

Néanmoins, si l'on considère les seuls teneurs en lipides totaux (de 1,56 à 2,10 pour les farines, de 6,9 à 9 pour les glutens), on constate qu'elles évoluent dans des limites relativement étroites, pour les deux substrats.

Cette constance relative dans la composition lipidique ressort également des valeurs exprimant les pourcentages que représentent les diverses fractions lipidiques par rapport aux protides totaux.

C'est ainsi que, dans les farines, les lipides libres représentent entre 13 et 15, 1 p. 100 du matériel azoté, les lipides liés entre 2 et 3,4 p. 100 et les phospholipides de 2,1 à 2,8 p. 100.

Il en est de même en ce qui concerne les glutens où des variations du même ordre s'observent pour les lipides libres (2,1 à 3,5 p. 100), les lipides liés (5,9 à 8,9 p. 100) et les phospholipides (2,7 à 3,6 p. 100).

Il convient d'ailleurs de noter, à l'inverse de ce qu'il serait logique d'admettre, que la proportion des lipides totaux par rapport aux protides est plus élevée dans les farines (de 15,2 à 18,2 p. 100) que dans les glutens (de 8 à 11,9 p. 100). Ceci laisse supposer, soit qu'une partie des lipides de la farine est éliminée avec les protéines solubles (type albumi-

nes-globulines) lors de l'isolement du gluten, soit que les lipides constituants du gluten n'ont pas été extraits en totalité dans nos conditions expérimentales. C'est un point important que nous nous proposons de vérifier dans des travaux ultérieurs.

En exprimant par ailleurs les teneurs en lipides libres et liés par rapport aux lipides totaux, il n'apparait pas non plus de différences très marquées entre les diverses farines ou les divers glutens analysés.

Il en va tout autrement si l'on compare parallèlement les farines et les glutens du point de vue des proportions respectives de leurs différentes fractions lipidiques.

Alors que dans les farines les lipides directement extractibles constituent de 80,5 à 87,2 p. 100 des lipides totaux, ils ne représentent plus que 24 à 35 p. 100 des constituants lipidiques des glutens isolés de ces mêmes farines. En d'autres termes, les lipides présents dans les farines à l'état lié forment de 12,8 à 19,5 p. 100 des lipides totaux, alors que dans les glutens correspondants cette proportion est comprise entre 65 et 76 p. 100.

Cette disproportion des lipides présents à l'état lié dans les farines et les glutens traduit de façon évidente les modifications de l'état de liaison des lipides dans la farine dès l'instant où elle est hydratée pour former une pâte. En ce sens, les chiffres obtenus confirment, tout en les précisant, les observations faites antérieurement sur pâtes (25).

D'un même point de vue, les valeurs du rapport Lipides liés/Lipides libres, établies à partir des teneurs correspondantes des farines et de leurs glutens, expriment les modifications qui interviennent lors de la confection de la pâte : compris entre 0,14 et 0,24 pour les farines, ce rapport atteint, dans le cas des glutens, des valeurs dont les limites extrêmes sont de 1,84 et 3,13.

Quant aux phospholipides, ils constituent, dans les farines, une fraction importante des lipides libres comprise entre 15,5 et 20 p. 100, sans toutefois que des différences très marquées apparaissent entre les échantillons.

Ces phospholipides, on les retrouve dans le gluten mais cette fois dans la fraction lipidique non extractible par l'éther, ce qui confirme également les notions généralement admises selon lesquelles l'hydratation des farines détermine une liaison préférentielle des constituants phospholipidiques initialement libres (22).

On notera que, dans les farines, les phospholipides représentent une fraction des lipides libres relativement constante d'un échantillon à l'autre, puisque leur taux est compris entre 15,5 et 20 p. 100.

Il ne semble pas qu'il en soit de même lorsqu'ils se trouvent à l'état lié dans le gluten puisqu'ils constituent, selon les cas, entre 35,5 et 51 p. 100 des lipides liés. Il y aurait peut-être là l'indice que les phospholipides

participent dans des proportions variables à l'association des lipides et des protéines selon l'origine et la nature du gluten ou, ce qui revient au même, selon les propriétés des farines. Cet aspect de la composition phospholipidique des glutens et de ses relations éventuelles avec la qualité des farines pourrait constituer le point de départ d'une étude ultérieure.

Quoi qu'il en soit, il semble bien que cette aptitude des farines à faire passer de l'état libre à l'état lié certains de leurs constituants lipidiques lorsqu'il a y intervention de l'eau, ne soit pas identique d'une farine à l'autre en dépit de différences de composition lipidique assez peu apparentes.

En effet, si l'on établit le rapport :

$$\frac{\text{Lipides liés p. 100 des Lipides totaux du Gluten}}{\text{Lipides liés p. 100 des Lipides totaux de la Farine}}$$

on constate qu'il diffère selon les échantillons : il est de 3,3 pour la farine F et de 5,4 pour la farine H. En d'autres termes, le pourcentage des lipides liés par rapport aux lipides totaux est, pour l'échantillon H, 5,4 fois plus élevé dans le gluten que dans la farine d'où il a été extrait ; ce pourcentage est seulement 3,3 fois plus élevé en ce qui concerne l'échantillon F. La valeur de ce rapport, que nous appelons *coefficient de fixation*, permettrait d'exprimer la plus ou moins grande aptitude d'une farine à lier certains de ses constituants lipidiques lorsqu'elle est hydratée en pâte pour en extraire son gluten. Il serait sans doute intéressant de pouvoir préciser si cette aptitude des farines à fixer plus ou moins les lipides présente ou non des relations avec leur qualité technologique.

B — Nature et importance respective des fractions phosphorées du gluten.

Dans le tableau II suivant ont été rassemblés les résultats concernant la composition phosphorée qualitative et quantitative de 10 échantillons de glutens comprenant les 7 précédemment étudiés avec leurs farines du point de vue lipidique, plus les échantillons C, I et J.

Ces résultats sont exprimés, d'une part en mg. de P p. 100 g. de gluten sec, d'autre part en p. 100 du phosphore total.

Du point de vue de leur teneur en phosphore total, les glutens étudiés constituent une gamme assez étendue puisque les valeurs s'échelonnent entre 154 (gluten J) et 293 mg. p. 100. de substance sèche (gluten E). On doit noter toutefois que, sur les 10 échantillons analysés, 8 présentent une teneur supérieure à 230 mg. p. 100 g, ce qui témoigne d'une certaine régularité de composition en phosphore total.

Pour la clarté de l'exposé, nous étudierons les différentes fractions phosphorées dans l'ordre correspondant au schéma suivi pour leur

fractionnement, tel qu'il a été décrit au chapitre « Conditions expérimentales ».

TABLEAU II

Répartition des différentes formes du phosphore dans le gluten.

Glutens	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
					mg p. 100 g subs. sèche					
P total	238	249	236	230	293	243	284	250	186	154
P lipides libres	3,20	2,90	3,10	3,00	3,40	4,80	3,10	5,00	1,35	2,60
P lipides liés	42,50	42,60	39,60	47,35	45,60	43,60	48,60	48,25	40,50	29,25
P minéral	53,30	47,30	51,10	36,90	77,70	36,00	49,10	50,20	39,60	21,25
P phytique	86,70	93,50	96,50	105,30	108,30	94,50	124,10	98,30	55,80	49,85
P désoxynucléique	25,00	23,80	25,80	26,10	45,50	44,00	43,30	37,40	26,90	17,90
P ribonucléique	24,60	37,40	13,60	18,40	14,30	29,10	17,90	7,60	18,40	25,50
ADN	250	238	258	261	455	440	433	374	275	183
ARN	256	389	141	191	177	303	186	79	191	265
ADN/ARN	0,98	0,61	1,82	1,36	2,56	1,45	2,32	4,73	1,44	0,69
					p. 100 du Phosphore total					
P lipides libres	1,4	1,2	1,3	1,3	1,2	2,0	1,1	2,0	0,7	1,7
P lipides liés	18,0	17,1	16,7	20,5	15,6	17,9	17,1	19,2	21,8	19,0
P minéral	22,6	19,0	21,5	16,0	26,8	14,8	18,0	20,0	21,3	13,8
P phytique	36,8	37,5	40,6	45,8	36,9	38,9	43,0	39,1	30,0	32,4
P désoxynucléique	10,6	11,3	10,9	11,3	15,5	18,1	15,2	15,0	14,5	11,6
P ribonucléique	10,4	15,0	5,8	8,0	4,9	11,9	6,3	3,0	10,0	16,5

Nous examinerons donc successivement les formes de phosphore présentes dans la fraction lipidique, celles qui sont extractibles à froid par l'acide perchlorique et enfin celles dont l'extraction s'effectue également en milieu perchlorique, mais à chaud.

PHOSPHORE LIPIDIQUE :

Les deux fractions lipidiques correspondant respectivement aux lipides libres et liés, ont été étudiées du point de vue quantitatif en ce qui concerne le phosphore; elles ont aussi donné lieu à d'autres déterminations, elles les unes quantitatives, les autres seulement qualitatives. Ces déterminations visant à préciser la nature de certains constituants éventuellement associés au phosphore, ont été effectuées également sur la fraction phosphospholipidique insoluble dans l'acétone dont nous avons vu qu'elle était présente dans le gluten à l'état lié.

PHOSPHORE DES LIPIDES LIBRES :

Les résultats du tableau II montrent que la fraction lipidique du gluten directement extractible par l'éther sulfurique contient seulement

des traces de phosphore représentant entre 1,35 et 5mg p. 100 g. de gluten sec, soit, par rapport au phosphore total, de 0,7 à 2 p. 100.

On peut admettre comme vraisemblable que le phosphore ainsi dosé est de nature phospholipidique. En effet, en traitant par l'acétone les lipides extraits par l'éther sulfurique, nous avons pu constater qu'une faible fraction, allant de 0,5 à 5 p. 100 selon les glutens, demeurait insoluble. Les très petites quantités de matériel lipidique ainsi obtenu ne nous ont pas permis d'entreprendre de déterminations complémentaires.

S'il s'agit bien de phospholopides, et si les traces de phosphore dosées dans cette fraction n'ont pas pour origine une imperfection de la séparation, il faudrait conclure qu'une très faible fraction des phospholipides constitutifs du gluten existe à l'état libre.

PHOSPHORE DES LIPIDES LIÉS :

Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail nous ont montré que les phospholipides constituent, pondéralement, de 35 à 51 p. 100 des lipides liés des glutens étudiés.

Les dosages de phosphore sur cette fraction extractible après action de l'éthanol à chaud et solubilisation dans le chlroroforme, donnent, selon les échantillons, entre 29,2 et 48,6 mg de phosphore pour 100 g de gluten sec, soit par rapport au phosphore total, de 15,6 à 21,8 p. 100.

La mise en évidence de la choline, après hydrolyse sodique de la fraction lipides liés, a permis de préciser que les phospholipides présents, ou du moins une partie d'entre eux, pouvaient être identifiés aux lécithines.

La présence de choline nous a conduits à déterminer, parallèlement au phosphore, la teneur en azote de cette fraction. Rapportée aux lipides liés, cette teneur varie, selon les échantillons, de 1 à 4,9 p. 100 et les rapports P/N correspondants sont compris entre 0,17 et 0,59. Comme ce rapport est de 2,2 pour les lécithines, il faut admettre qu'une partie de l'azote dosé n'est pas de nature phospholipidique.

En se basant sur les teneurs en phosphore, il est possible de calculer les teneurs théoriques en azote lécithinique et d'en déduire celles concernant l'azote ayant une autre origine. On aboutit ainsi à des teneurs comprises entre 0,8 et 4,5 p. 100 et, en admettant qu'il s'agit d'azote protéique ou peptidique, la fraction des lipides liés, soluble dans le chloroforme contiendrait, selon les glutens considérés, entre 4,6 et 25,8 p. 100 de constituants azotés non lipidiques.

Cette constatation nous a amenés à confirmer par l'expérience la présence de protéines ou de peptides. Pour chaque gluten, la fraction « lipides liés » a été soumise à une hydrolyse acide en tube scellé et l'hydrolysat obtenu, analysé par chromatographie sur papier. Le traitement des

chromatogrammes à la ninhydride nous a permis de mettre en évidence la présence des 17 acides aminés suivants : alanine, acide aspartique, acide glutamique, arginine, cystine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine.

Il apparait donc que la fraction du gluten, considérée comme étant de nature lipidique du fait de sa solubilité dans le chloroforme, se révèle en fait comme une association, un complexe lipidoprotidique, qui n'est pas sans présenter certaines analogies avec d'autres complexes de même nature d'origine animale.

On pourrait a priori réfuter la nature lipido-protéique de la fraction lipides liés et expliquer la présence de protéines dans cette fraction par le seul fait qu'elle a été isolée du gluten après action prolongée de l'éthanol à chaud.

En effet, l'extraction classique des protéines type gliadine fait intervenir un traitement du gluten par l'éthanol contenant environ 30 p. 100 d'eau ; le fait de soumettre le gluten à l'action de l'éthanol 95 p. 100 permet-il d'affirmer qu'aucun constituant de nature protéique n'est extrait dans ces conditions ? Certainement pas, et, comme il est possible de le constater expérimentalement, il ne fait aucun doute que l'éthanol solubilise ainsi, en même temps que des lipides, des constituants de nature protéique.

Or les déterminations rapportées dans ce travail n'ont pas été faites sur le matériel total extrait par l'éthanol, mais sur la seule fraction de ce matériel soluble dans le chloroforme qui, s'il est un solvant spécifique des lipides, est également un agent de déprotéinisation.

La présence des 17 acides aminés identifiés dans cette fraction doit donc être interprétée comme une preuve de sa nature lipido-protidique et non comme l'indice d'un artefact expérimental ; elle ne nous permet pas toutefois de préciser si les constituants protidiques associés aux lipides sont de nature protéique ou peptidique. A en juger par les teneurs en azote total, le rapport lipides/protides varierait selon l'origine du gluten.

De tout récents travaux ont révélé que, dans la farine, protéines et lipides étaient intimement associés (10-29) et que l'hydrolyse acide de certaines fractions lipido-protéiques extraites de farines libérait au moins 9 acides aminés dont 2 ont été identifiés comme étant la proline et la sérine (13). BOTTOMLEY et coll. (3) ont déterminé quantitativement 17 acides aminés obtenus après hydrolyse des lipides extraits de différents glutens par l'éthanol aqueux et isolés dans CCl_4 anhydre.

Nos résultats confirment cette association intime des lipides et des protéines tout en montrant que dans le gluten, une fraction seulement de ces lipides demeure fortement liée aux protéines et qu'elle ne peut en

être isolée qu'à l'état de complexe lipido-protidique dans lequel les protéines ou les peptides atteindraient des proportions comprises, selon les glutens, entre 5 et 26 p. 100.

Il restait toutefois à préciser si les constituants protidiques mis en évidence étaient associés à la totalité des lipides liés ou spécifiquement à certains d'entre eux et, dans cette éventualité, quelle en était la nature.

A cet effet, la fraction lipides liés, soluble dans le chloroforme après extraction à l'éthanol, a été soumise à l'action de l'acétone, ce qui a permis de différencier 2 fractions lipidiques : l'une soluble, et présentant de ce fait les propriétés des lipides simples type glycérides, l'autre insoluble, répondant aux caractéristiques des lipides complexes, type phospholipides.

Chacune de ces fractions a été hydrolysée en tube scellé par HCl 6N. Un essai préliminaire a montré que seule la fraction phospholipidique donnait, après hydrolyse, une réaction positive à la ninhydrine, aucune coloration n'étant fournie par les produits d'hydrolyse de la fraction des lipides liés solubles dans l'acétone. Soumis à la chromatographie bidimensionnelle sur papier, l'hydrolysat de la fraction phospholipidique a permis de mettre en évidence la présence des mêmes 17 acides aminés identifiés antérieurement dans la fraction des lipides liés totaux.

Il apparait donc que, dans la fraction du gluten dénommée lipides liés, seuls les phospholipides seraient engagés dans un complexe avec les protéines ou les peptides, à l'exclusion des lipides simples de cette fraction.

Ce fait semble confirmer de façon satisfaisante deux hypothèses émises ces dernières années : d'une part que l'association des protéines s'effectuerait de façon préférentielle avec les phospholipides, d'autre part que la structure même des phospholipides leur confère naturellement le rôle d'agents de liaison entre lipides simples et protéines (7-17-19).

Si l'on considère d'autre part la présence simultanée du phosphore et de la choline, l'appartenance au groupe des lécithines des phospholipides associés aux protéines ne semble pas devoir être mise en doute. Mais il n'est pas certain que les lécithines soient les seuls constituants. En effet, une hydrolyse ménagée de cette fraction phospholipidique, suivie d'une chromatographie unidimensionnelle sur papier, nous a permis de mettre en évidence la présence de 2 sucres identifiés comme étant le galactose et l'arabinose.

Il semble donc que la fraction des lipides du gluten liés aux protéines ou aux peptides pourrait être constituée, outre des phosphatides à base de choline, d'autres lipides complexes à base de pentose et d'hexose. Il s'agirait alors d'une association beaucoup plus complexe à laquelle participeraient à la fois lipides, protéines ou peptides et sucres.

Déjà GUILLEMET (16), considérant que le gluten pouvait constituer un complexe binaire, avait émis l'hypothèse qu'au sein de la farine des glu-

cides pourraient être associés aux agrégats lipido-protéiques. Certaines observations récentes semblent être venues depuis confirmer cette façon de voir. C'est ainsi que CARTER et coll (9) séparent, à partir d'un extrait benzénique de farine, 4 fractions dont une, de nature lipido-glucidique, contient des galactosyl-glycérides. Les mêmes constituants sont identifiés par MASON et JOHNSON (20), à côté des phosphatides à base de choline, après traitement de la farine par le butanol saturé d'eau et fractionnement des lipides extraits. COPPOCK (11) signale également la présence de galactose aux côtés du palmitate de sitostérol et de phosphatides dans certaines fractions des lipides libres de la farine ayant subi un vieillissement de plusieurs mois.

Le fait qu'une importante fraction des lipides de la farine passe de l'état libre à l'état lié lors de la transformation en pâte permet de rendre compte que certains constituants des lipides, identifiés dans la farine, se retrouvent dans le gluten. En ce sens, la mise en évidence du galactose aux côtés de l'arabinose, dans la fraction phospholipidique du gluten, confirme les observations faites par ZENTNER (29) au cours d'un fractionnement du gluten humide par action conjointe de l'acétone, de l'éthanol et de l'eau.

Considérées dans leur ensemble, ces diverses données expérimentales suffisent à démontrer l'extrême complexité des constituants lipidiques des farines ou des glutens et à mettre l'accent sur le rôle particulier joué par les phospholipidiques vis à vis des autres constituants de nature protidique et glucidique.

PHOSPHORE ACIDO-SOLUBLE MINÉRAL ET ORGANIQUE :

Le traitement du gluten délipidé par l'acide perchlorique 0,25N à basse température permet d'en isoler d'autres constituants phosphorés dont une importante fraction est de nature minérale.

A l'analyse, les extraits perchloriques donnent directement la coloration de l'ortho-phosphate, mais il faut procéder à une minéralisation pour déterminer la totalité du phosphore présent. Par différence entre le phosphore total et le phosphore minéral dosés, on détermine une fraction phosphorée de nature organique. Nous avons constaté qu'en soumettant les extraits perchloriques à une hydrolyse légère, il n'y avait pas de libération d'ortho-phosphate ; ceci témoigne de l'absence de tout groupement phosphate labile de nature minérale ou organique.

Les résultats du Tableau II indiquent que la teneur en phosphore minéral des glutens étudiés varie de façon assez importante puisqu'elle peut-être comprise entre 21,2 et 77,7 mg p. 100, ce qui correspond à des variations allant de 13,8 à 26,8 p. 100 du phosphore total des glutens analysés.

L'existence de constituants phosphorés de nature organique, mise en évidence par l'analyse, nécessitait leur identification.

Le traitement des extraits perchloriques par la mixture magnésienne dans les conditions indiquées a permis, par des déterminations quantitatives, de vérifier que la totalité des formes phosphorées minérales et organiques étaient ainsi précipitées.

L'identification des constituants phosphorés a pu être faite en chromatographiant dans divers solvants l'extrait chlorhydrique du précipité obtenu, parallèlement à des marqueurs connus.

C'est ainsi qu'à côté de l'orthophosphate, on a pu mettre en évidence la présence d'un ester phosphate présentant dans les solvants de GERLACH (14) et ANDERSON (1) un comportement très voisin, sinon identique, de celui de l'acide phytique utilisé comme marqueur.

Il ne nous est pas possible de préciser si le composé ainsi séparé correspond à de l'acide phytique libre ou à son sel double de calcium et de magnésium : la phytine. On peut par contre considérer comme certain qu'aucun des esters intermédiaires entre l'inositol et son hexaphosphate n'est présent dans les extraits perchloriques des glutens étudiés.

Ces diverses remarques nous amènent donc à conclure que le constituant phosphoré organique du gluten extrait avec l'ortho-phosphate en milieu perchlorique à basse température est de nature phytique.

Les échantillons de glutens analysés présentent des teneurs également très variables en phosphore phytique puisqu'elles sont comprises entre 55,8 et 124,1 mg p. 100 g de matière sèche. Exprimé en fonction du phosphore total, le phosphore phytique représente de 30 à 46 p. 100 selon les échantillons.

PHOSPHORE NUCLÉIQUE :

L'extraction perchlorique à froid laisse un résidu protéique dont la teneur en phosphore représente, selon les cas, de 17 à 30 p. 100 du phosphore total initialement présent dans les glutens.

L'extraction de ce phosphore résiduel a pu être effectuée dans sa totalité en soumettant le matériel protéique à plusieurs extractions successives par l'acide perchlorique 0,5 N à 70°C. On sait que cette technique proposée par OGUR et coll. (24) permet l'extraction des constituants de nature nucléique, au même titre d'ailleurs que la méthode de SCHNEIDER qui utilise l'acide trichloracétique 5 p. 100 à 90°C. Nous avons indiqué les raisons qui nous ont fait préférer l'extraction perchlorique.

Tous les extraits ainsi obtenus présentaient une forte absorption dans la région ultra-violette du spectre voisine de 265 mμ. Les protéines ne pouvant être considérées a priori comme responsables de cette absorp-

tion du fait de l'utilisation de l'acide perchlorique, seuls des constituants de nature nucléique pouvaient en être la cause.

Étude qualitative :

Des essais qualitatifs préliminaires ont donc été entrepris en vue de préciser la nature des composés nucléiques ainsi extraits.

Deux réactions colorées caractéristiques de l'acide désoxyribonucléique, pratiquées sur les extraits perchloriques, se sont révélées positives. Dans la première, l'A D N fournit, en présence d'indole, une coloration jaune dont le maximum d'absorption se situe à 490 mμ. Elle est à la base de la microméthode de dosage de l'A D N proposée par CERIOTTI.

La seconde réaction utilise la coloration bleue que donne l'A D N en présence de diphénylamine. BURTON (8) a accru fortement la sensibilité de la méthode, initialement proposée par DISCHE, en ajoutant de l'acétaldéhyde au milieu réactionnel ; la coloration présente un maximum d'absorption à 600 mμ.

Appliquée d'autre part aux mêmes extraits perchloriques, la réaction classique de BIAL à l'orcine, caractéristique des pentoses, s'est également révélée positive. Venant, dans une certaine mesure, confirmer les 2 tests colorés précédents témoignant de la présence d'A D N, une telle réaction ne pouvait être toutefois considérée comme spécifique de la présence d'A R N, le désoxyribose fournissant un test positif au même titre que le ribose.

Il était donc nécessaire de vérifier la présence présumée d'A R N par des tests plus spécifiques que la présence de phosphore, l'absorption ultraviolette ou la réaction de BIAL. La seule possibilité consistait à identifier l'A R N par l'intermédiaire d'un des ses constituants pyrimidiques, l'acide uridylique, seul nucléotide qui permette de le différencier spécifiquement de l'A D N.

A cet effet, nous avons tenté d'isoler les constituants nucléiques présents dans l'extrait perchlorique en les complexant par les métaux lourds.

Dans un essai préliminaire, le traitement de l'extrait perchlorique par le nitrate d'argent à pH 8,5 a permis d'isoler un précipité ; nn traitement ultérieur par HCl 0,1N en déplace le métal.

Chromatographié dans le Butanol 3re-chlorhydrique, après avoir été hydrolysé, l'extrait nucléique obtenu a révélé la présence massive d'adénine, de guanine et d'acide cytidylique ainsi qu'une tache de faible intensité de même Rf que l'acide uridylique.

L'argent n'étant pas un excellent agent de précipitation des nucléotides pyrimidiques, nous avons repris ces essais en utilisant successivement l'action des sels de plomb (acétate) et d'argent (nitrate) dans les conditions décrites antérieurement.

Les précipités séparés respectivement par le plomb et l'argent ont été traités par H_2S et les extraits nucléiques obtenus ont été chromatographiés après hydrolyse.

L'examen des chromatogrammes dans l'ultraviolet a permis d'identifier cette fois de façon nette, et tout particulièrement dans la fraction précipitée par le plomb, la présence d'acide uridylique parallèlement aux autres constituants puriques et pyrimidiques déjà mis en évidence.

L'identité de l'acide uridylique ainsi isolé a été confirmée en déterminant la spectre d'absorption des taches, préalablement découpées et éluées, ainsi que les rapports des densités optiques à 278 et 262 mμ. On a trouvé que $\frac{\varepsilon\ 278}{\varepsilon\ 262}$ était compris entre 0,45 et 0,49.

En tant que constituant spécifique, l'acide uridylique ainsi identifié témoigne donc que l'acide ribonucléique est bien présent aux côtés de l'A D N dans les extraits perchloriques, la présence de guanine d'adénine et d'acide cytidylique venant apporter confirmation de l'existence simultanée dans le gluten des 2 types d'acides nucléiques.

Cette certitude étant acquise, il restait encore à préciser dans quelle mesure l'acide perchlorique était capable de respecter ou de modifier les liaisons unissant les acides nucléiques aux autres constituants du gluten.

A cet effet, une partie aliquote de l'extrait nucléique obtenu après traitement au nitrate d'argent a été soumise à une hydrolyse acide poussée, en tube scellé. Traité en chromatographie bidimensionnelle l'hydrolysat a révélé la présence des mêmes 17 acides aminés identifiés dans la fraction des lipides liés, avec en plus, celle de l'hydroxyproline.

Bien qu'il s'agisse uniquement d'essais qualitatifs, nous avons pu noter une coloration marquée des taches correspondant aux 3 acides diaminés : arginine, lysine et histidine.

Ainsi, malgré l'intervention d'un réactif tel que l'acide perchlorique dont la propriété essentielle est d'insolubiliser les protéines, les acides nucléiques isolés du gluten demeurent associés fortement à des molécules peptidiques ou protéiques dont le caractère basique semble ressortir de leur richesse apparente en acides diaminés. Bien qu'elles ne nous permettent pas de préciser si cette association intéresse les 2 types d'acides nucléiques, toutes ces observations témoignent de la nature nucléoprotéique des constituants nucléiques du gluten.

Étude quantitative :

Les résultats rapportés dans le Tableau II précisent l'importance respective des formes désoxyribo et ribonucléiques du phosphore dans les divers échantillons de glutens étudiés. Avant d'en faire état, il est utile de préciser les conditions ayant conduit à ces résultats.

D'une part, les teneurs en phosphore nucléique total ont été déterminées directement sur les extraits perchloriques après minéralisation. D'autre part, la mesure à 265 mμ des densités optiques des mêmes extraits a permis de déterminer la teneur de chaque gluten en acides nucléiques totaux et d'apprécier ainsi, de façon indirecte, les concentrations correspondantes en phosphore nucléique total.

Il était à craindre, dans ce dernier cas, que la présence des protéines ou des peptides liés aux constituants nucléiques, en créant une absorption ultraviolette parasite, ne conduise à des teneurs en phosphore nucléique erronées. Cependant, nous avons pu constater une concordance satisfaisante dans les résultats obtenus selon ces deux méthodes, ce qui laisse supposer que l'interférence des constituants non nucléiques peut être considérée comme négligeable.

En définitive, nous avons retenu comme valeurs de phosphore nucléique total la moyenne des 2 résultats.

En pratiquant ensuite la microméthode à l'indole, nous avons pu déterminer les concentrations de chaque gluten en A D N et, par suite, les teneurs correspondantes en phosphore désoxyribonucléique.

Enfin, les teneurs en phosphore ribonucléique ont été obtenues par différence entre le phosphore nucléique total et le phosphore désoxyribonucléique.

Les teneurs en A R N ont été déterminées de la même façon, en retranchant des valeurs en acides nucléiques totaux obtenues par absorption ultraviolette, les valeurs d'A D N dosées par l'indole.

L'examen du Tableau II révèle que les 2 types d'acides nucléiques sont répartis de façon très inégale dans les divers échantillons de glutens analysés. Les teneurs en phosphore ribonucléique oscillent entre 7,6 et 37,4 mg, celles en phosphore désoxyribonucléique entre 17,9 et 45,5 mg pour 100 g de matière sèche.

Lorsque ces teneurs sont exprimées par rapport au phosphore total, le phosphore désoxyribonucléique en constitue de 10,6 à 18, 1 p. 100, ce qui témoigne d'une constance de composition assez relative, alors que le phosphore ribonucléique accuse des proportions très variables d'un gluten à l'autre puisqu'il forme entre 3 et 16,5 p. 100 du phosphore total.

Les constituants nucléiques présents dans le gluten représentent donc une fraction non négligeable de son phosphore total puisque l'on atteint des taux en phosphore pouvant aller de 17 à 30 p. 100.

Sur le tableau II ont été indiquées parallèlement les teneurs respectives des glutens analysés en ADN, ARN, ainsi que les valeurs correspondantes du rapport ADN/ARN. Ce rapport apparait extrêmement variable puisque, selon les cas, il peut être soit inférieur (de 0,69 à 0,98) soit supérieur à l'unité (de 1,36 à 4,73). Il semble que l'ARN soit le principal responsable de cette variation puisque ses teneurs varient dans le

rapport de 1 à 5 (79 à 389 mg p. 100 g) alors que pour l'ADN ce rapport n'est que de 1 à 2,4 (183 à 455 mg p. 100 g).

Si l'on considère d'autre part que le phosphore désoxynucléique représente, par rapport au phosphore total du gluten, une fraction relativement constante (11 à 18 p. 100 environ) on peut peut-être voir dans le rapport ADN/ARN une valeur caractéristique de la variété du blé dont provient le gluten, de même que l'on considère la valeur de ce rapport comme spécifique de certains tissus.

Il convient de noter en effet que les blés utilisés dans ces essais, à l'exception des échantillons I et J, d'origine commerciale, sont des variétés pures.

En dépit de la complexité des conditions expérimentales qu'elle met en œuvre, la détermination quantitative des deux types d'acides nucléiques dans le gluten offrirait peut-être une possibilité d'identification des différentes variétés de blé, ce qui serait susceptible d'aider utilement les généticiens.

Quant à l'interprétation biologique de la présence dans le gluten des deux types d'acides nucléiques, il est probable que l'ARN et l'ADN représentent les éléments résiduels du cytoplasme et du noyau des cellules jeunes du grain, transformées progressivement en cellules de réserve par suite du développement des amyloplastes.

C — Association des proteines et des différentes du phosphore dans legluten

Selon nos résultats, 14 à 27 p. 100 environ du phosphore présent dans le gluten se trouvent à l'état minéral ; en d'autres termes, les trois quarts au moins de ce phosphore sont de nature organique.

Si l'on admet que ces constituants phosphorés sont associés aux protéines du gluten dans des combinaisons plus ou moins stables, on peut essayer de préciser l'importance de cette association, pour chacun des glutens étudiés, en rapportant à l'azote total les concentrations en phosphore minéral, lipidique, phytique et nucléique déterminées.

C'est ce que nous avons voulu exprimer par les valeurs figurant dans le tableau III suivant :

Tableau III

Glutens	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	p. 100 de l'Azote total									
P minéral ..	0,39	0,33	0,38	0,24	0,59	0,24	0,37	0,36	0,28	0,14
P lipides « liés »	0,31	0,30	0,29	0,31	0,34	0,29	0,36	0,35	0,28	0,20
P désoxynucléique ...	0,18	0,17	0,19	0,17	0,34	0,30	0,32	0,27	0,19	0,12
P ribonucléique ...	0,18	0,26	0,10	0,12	0,11	0,20	0,14	0,05	0,12	0,18
P phytique..	0,63	0,66	0,72	0,70	0,82	0,64	0,94	0,71	0,39	0,34

On voit que l'ion phosphate est susceptible de s'associer aux protéines dans des proportions assez variables puisque, selon les glutens, le phosphore minéral constitue de 0,14 à 0,59 p. 100 de l'azote total. Qu'il s'agisse d'une simple adsorption des phosphates à la surface du matériel protéique ou de liaisons mettant en jeu certains groupements fonctionnels, il est possible que cette association phosphates-protéines exprime un des aspects physico-chimiques des propriétés du gluten.

En ce qui concerne le phosphore appartenant a la fraction des lipides liés, il n'apparait pas qu'il y ait de grandes différences d'un gluten à l'autre, puisqu'il représente de 0,20 à 0,36 p. 100 de l'azote. Il semblerait donc que l'association protéines-phospholipides s'effectue dans des proportions relativement constantes.

Autre forme organique, le phosphore mucléique total, exprimé par rapport à l'azote total du gluten, accuse certaines variations non négligeables (0,29 à 0,50 p. 100). Si l'on considère séparément les 2 types nucléiques, leur association avec les protéines semble être plus irrégulière en ce qui concerne l'acide ribonucléique (0,05 à 0,26) que pour l'acide désoxynucléique (0,12 à 0,34). Comme les résultats antérieurs semblent le montrer, les liaisons qui interviennent dans cette association des protéines et du phosphore nucléique sont vraisemblablement du même type que celles existant habituellement dans les nucléoprotéines.

Avec le phosphore phytique, dont les proportions par rapport à l'azote varient environ du simple au triple (de 0,34 à 0,94), il semble que l'on soit en présence d'une autre forme du phosphore pouvant donner lieu à des associations variables selon l'origine du gluten. Mais s'agit-il, là encore, d'une simple fixation de nature physique ou d'une association réelle entre les protéines et les phytates mettant en jeu des liaisons de nature chimique. Le travail n'a pas été suffisamment poussé pour permettre de le préciser. Toutefois, si l'on s'en réfère à certains faits expérimentaux, il n'est pas interdit d'envisager qu'il s'agirait, dans ce cas particulier, d'un véritable complexe entre les protéines et le phosphore phytique. On possède en effet actuellement un certain nombre d'arguments en ce sens.

Ainsi que l'ont montré COURTOIS et BARRE (12), l'acide phytique insolubilise les protéines en se combinant à leurs groupements basiques : ils ont observé que la teneur en phosphore phytique du précipité obtenu est proportionnelle au nombre de groupements basiques de la protéine. BOURDILLON (6) avait déjà isolé, à partir de graines de haricot, un complexe cristallisé protéine-acide phytique, et SMITH et RACKIS (27) ont constaté à leur tour, au cours de l'extraction des protéines du soja, que la phytine réagissait avec les protéines pour former des complexes de composition variée.

En ce qui concerne les protéines de la farine de blé, on connaît

l'influence exercée par la concentration en sel et la nature du sel sur la solubilité des albumines, des globulines et de la gliadine, mais on s'est peu préoccupé d'étudier l'influence des phytates naturellement présents dans les farines. Un seul travail (15) a révélé que le degré de solubilisation de la gliadine par l'eau diminue fortement en présence de phytine.

Il semble donc que la présence de phosphore phytique dans le gluten dans des proportions variant selon son origine, puisse être interprétée comme l'indice d'une aptitude plus ou moins marquée des protéines à former des complexes avec ce constituant phosphoré. Nous essaierons de préciser ces hypothèses dans une étude ultérieure.

III. — CONCLUSIONS

Les résultats obtenus au cours de ce travail et les interprétations qui en ont été données nous permettent de dégager les conclusions suivantes :

1° Il n'apparait pas que l'on puisse différencier les farines entre elles d'après leur composition en constituants lipidiques (lipides libres, liés et phospholipides).

— Exprimées soit par rapport à la substance sèche, soit par rapport aux protides, les proportions de ces lipides évoluent dans des limites assez étroites. Les mêmes observations s'appliquent aux glutens isolés des farines.

— On constate d'autre part que les lipides liés représentent entre 15 et 20 p. 100 des lipides totaux des farines ; cette proportion atteint de 65 à 75 p. 100 dans les glutens correspondants. De même, le rapport lipides liés/lipides libres, compris entre 0,14 et 0,24 selon les farines, atteint des valeurs comprises entre 2 et 3 pour les glutens.

— Les phospholipides eux-mêmes ne font pas apparaître de différences appréciables entre les farines, puisqu'ils représentent une fraction des lipides libres sensiblement constante. Il n'en est pas de même avec les glutens puisque, selon l'origine de la farine, les phospholipides peuvent constituer de 35 à 50 p. 100 des lipides liés.

— Enfin toutes les farines ne présentent pas la même aptitude à lier les lipides après leur transformation en pâte, comme le montre le « coefficient de fixation » défini par le rapport : $\frac{\text{Lipides liés du Gluten}}{\text{Lipides libres de la farine}}$ (en p. 100 des lipides totaux) qui varie de 3,3 à 5,4 selon les variétés de blé.

2° En appliquant aux glutens extraits des farines étudiées la technique de fractionnement décrite, nous avons pu préciser la nature des différentes formes de phosphore présentes et déterminer leur importance respective.

Outre l'ortho-phosphate, qui semble représenter la seule forme minérale, les glutens renferment trois types de constituants phosphorés organiques de nature lipidique, phytique et nucléique.

— *Le phosphore lipidique*, présent dans la fraction des lipides « liés », représente de 16 à 22 p. 100 du phosphore total. Cette fraction ne peut être isolée qu'à l'état de complexe dans lequel les lipides demeurent étroitement associés à des constituants de nature protéique ou peptidique, ainsi qu'en témoignent les acides aminés libérés par hydrolyse. Le rapport protides/lipides varie selon l'origine des glutens.

Les constituants lipidiques de ce complexe comprennent, outre des lipides simples, des phosphatides à base de choline et d'autres lipides à base de galactose et d'arabinose.

Le fait que, seule la fraction phospholipidique du complexe libère des acides aminés après hydrolyse, semble indiquer une liaison particulièrement forte entre les protéines et les phospholipides et renforcer l'hypothèse attribuant à ces derniers le rôle d'agents naturels de liaison entre les lipides simples et les protéines.

— *Le phosphore phytique*, extrait avec l'ortho-phosphate par l'acide perchlorique à froid, constitue de 30 à 46 p. 100 du phosphore total. La nature de ce constituant organique du gluten a été précisée par chromatographie.

— Diverses déterminations qualitatives ont démontré la nature *nucléique* des constituants du gluten extraits par l'acide perchlorique à chaud et mis en évidence la présence des 2 types d'acides nucléiques. Ceux-ci demeurent fortement fixés à des molécules protéiques ou peptidiques dont le caractère basique semble ressortir de leur richesse en acides diaminés. L'hydroxyproline est présente dans cette fraction nucléoprotéique du gluten.

Les deux types d'acides nucléiques sont répartis de façon très inégale selon l'origine du gluten. Le phosphore désoxyribonucléique constitue de 11 à 18 p. 100 du phosphore total, le phosphore ribonucléique de 3 à 17 p. 100.

Nous nous proposons d'examiner si les proportions respectives de l'ARN et de l'ADN présents dans le gluten peuvent constituer un caractère variétal.

— Nous avons enfin essayé d'évaluer le degré d'association des protéines avec les différentes formes du phosphore identifiées et dosées. Il semble que le phosphore phytique puisse donner lieu à des associations variables selon l'échantillon étudié. Un travail ultérieur essaiera de préciser cet aspect particulier des constituants phosphorés du gluten.

Reçu pour publication le 1er *octobre* 1960

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Anderson (G.). — Paper chromatography of inositol phosphates, *Nature*, **175**, 863, 1955.

(2) Bequette (R. K.), Miller (B. S.), Johnson (J. A.) et Schrenk (WG.). — Mineral composition of gluten, starch and water soluble fractions of wheat flour and its relationship to flour quality. *Abstr. 43d Annual Convention Am. Ass. Cereal Chem.* p. 23, 7 avril 1958.

(3.) Bottomley (R. A.) Mac Auslan (B. R.) et Powel (A. D. G.). — The lipid protein complex of wheat flour. *Chem. Ind.*, **45**, 1476, 1958.

(4) Bourdet (A.). — Les Protides des céréales. *Ann. Technol.*, INRA n°2, 181-318, 1956.

(5) Bourdet (A.) et Herard (J.). — Évolution des constituants phosphorés du grain de blé au cours de sa maturation. Acides nucléiques et synthèse protéique. *Ann. Physiol, végét.*, **1**, 29, 1959.

(6) Bourdillon (J.). — A crystalline bean seed protein in combination with phytic acid. *J. Biol. Chem.*, **189**, 65, 1951.

(7.) Bungenberg de Jong (H. L.). — Gluten oxydation and fatty substances. *Rev. Ferment. Ind. Alim.*, **11**, 261, 1956.

(8) Burton (K.). — A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**, 315, 1956.

(9) Carter (H. E.), McCluer (R. H.) et Slifer (E. D.). — Lipids of wheat flour I Characterization of galactosylglycerol components. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 3735, 1956.

(10) Cookson (M. A.), Ritchie (M. L.) et Coppock (J. B. M.). — *J. Sc. Food Agric.*, **8**, 105, 1957.

(11) Coppock (J. B. M.). — The fatty components in flour. Their significance *Milling*, **132**, 316, 1959.

(12) Courtois (J. E.) et Barre (R.). — Recherches sur les combinaisons des protéines avec les composés phosphorés : I : étude de l'amando-globuline, de la légumine et de l'insuline. — II : Etude des combinaisons de l'acide béta-glycérophosphorique et de l'acide phytique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 913 et 921, 1953.

(13) Fisher (N.), Ritchie (M. L.) et Coppock (J. B. M.). — Flour lipids characterizations ; chromatographic and other studies. *Chem. Ind.*, **6**, 147, 1958.

(14) Gerlach (E.) et Weber (E.). — Papierchromatographische Trennungsmethode für die saurelöslichen Phosphorverdindungen aus Nierengewek. *Arch. Expér. Pathol. u. Pharmakol.*, **224**, 496, 1955.

(15) Guastalla (J.). — Commission d'Études sur la Qualité du Gluten CNERNA. Communication privée 1953.

(16) Guillemet (R.), Sonntag (G.) et Guilbot (A.). — Sur le gluten de la farine de blé. *C. R. Acad. Agr. France*, **28**, 491- 1942.

(17) Hess (K.). — Die Bedeutung von Zwickelprotein und Haft protein im Weizenmehl für Teig. Brot und Geback. *Kolloid Z*, **141**, 61, 1955.

(18) Hogstrom (G.). — Paper chromatography of amino acids, sugars and acids. *Acta Chem. Scand.*, **11**, 473, 1957.

(19) Jewell (P. S.). — Phosphorus in gluten. *British Baker*, **126**, 93, 1953.

(20) Mason (L. H.) et Johnston (A. E.). — Comparative study of wheat flour phosphatides. *Cereal Chem.*, **35**, 435, 1958.

(21) Mecham (D. K.) et Weinstein (N. E.). — Lipid binding in doughs. Effect of dough ingredients. *Cereal Chem.*, **29**, 448, 1952.

(22) Mecham (D. K.) et Pence (J. W.). — Flour lipids, an unappreciated factor governing flour quality. *Bakers Digest*, **31**, 40, 1957.

(23) NEUFELD (C. H. H.) et MECHAM (D. K.). — The presence of phosphorus in protein preparations from wheat flour. *Amer. Assoc. Cereal Chem. Abstr.* 41*st Ann. Convent.* p. 39, 1956.
(24) OGUR (M.), -MINCKLER (S.), LINDEGREN (G.) et LINDEGREN (C. C.). — The nucleic acids in a polyploïd series of Saccharomyces. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 175, 1952.
(25) OLCOTT (H. S.) et MECHAM (D. K.). — Characterization of wheat gluten I. Protein-lipid complex formation during doughing of flours. Lipoprotein nature of the glutenin fraction. *Cereal Chem.*, **24**, 407, 1947.
(26) REDFIELD (R. R.). — A two dimentionnal paper chromatographic method with a high resolving power for separating amino-acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 344, 1953.
(27) SMITH (A. K.) et RACKIS (J. J.). — Phytin elimination in soybean protein isolation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 633, 1957.
(28) WADE (H. E.) et MORGAN (D. M.). — Fractionation of phosphates by paper ionophoresis and chromatography. *Biochem. J.*, **60**, 264, 1955.
(29) ZENTNER (H.). — Flour lipids : a note on the acetone — soluble fraction *Chem. Ind.*, **6**, 129, 1958.

DOSAGE DE L'ACIDE SORBIQUE DANS LES BOISSONS

PAR

P. JACQUIN

Station de Recherches cidricoles,
Centre de Recherches agronomiques de l'Ouest, Rennes.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**
II. — **Propriétés générales de l'acide sorbique.**
III. — **Méthodes de dosage de l'acide sorbique.**
a) Méthodes spectrophotométriques.
b) Méthodes chromatographiques.
c) Méthodes colorimétriques.
d) Méthode chimique.
IV. — **Conclusions.**
V. — **Bibliographie.**

I. — Introduction

Une circulaire du 15 octobre 1959 adressée par M. le Ministre de l'Agriculture au personnel du Service de la Répression des Fraudes autorise l'emploi de l'acide sorbique dans les vins à la dose limite de 200 mg par litre dans le but de les conserver sucrés, à condition de réduire la dose maxima d'anhydride sulfureux à 250 mg par litre.

D'autres circulaires (17 janvier 1959 et 6 novembre 1959) ont également autorisé l'emploi de l'acide sorbique pour la conservation des châtaignes, ainsi que dans les matériaux d'emballage destinés notamment aux produits laitiers (beurres, fromages, margarines).

L'utilisation de ce conservateur est également autorisée par la Législation de nombreux pays et à des doses notablement plus élevées que celle tolérée en œnologie française (de 1 à 2 g au kg en Allemagne Fédérale par exemple).

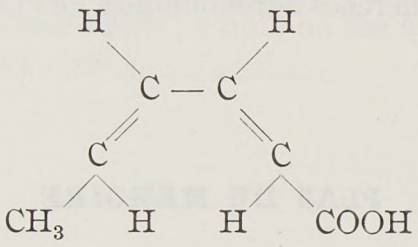
Il est donc indispensable que non seulement les laboratoires officiels, mais également les laboratoires industriels et privés disposent d'une méthode précise de dosage de l'acide sorbique, et si possible d'une méthode alliant à la précision, une facilité d'exécution sans nécessiter l'emploi d'un appareillage excep-

tionnel et coûteux, c'est-à-dire utilisable dans tous les laboratoires, même ceux qui ne peuvent s'équiper d'un spectrophotomètre ou de matériel de chromatographie.

II. — Propriétés générales de l'acide sorbique

Il a été ainsi nommé parce qu'il fut obtenu pour la première fois sous forme d'un produit cristallisé du jus de sorbes (*sorbus aucuparia*), par A. W. Hofmann en 1859.

C'est un mono-acide diéthylénique de formule brute $C_6H_8O_2$, dont la dénomination exacte est : hexadiène 2-4 oïque, répondant à la formule $CH_3 — CH = CH — CH = CH — COOH$ et possédant une configuration trans-trans :



L'acide sorbique est maintenant fabriqué industriellement en partant de l'aldéhyde crotonique et de cétène par condensation à l'aide d'acide sulfurique et de fluorure de bore en solution éthérée.

a) Propriétés physiques.

L'acide sorbique se présente sous forme d'une poudre cristallisée blanche, point de fusion .: vers 134°. Il possède un faible parfum aromatique, un goût légèrement acide. Il est peu soluble dans l'eau froide (0,16 g % à 18°C), plus soluble dans l'eau chaude (3,90 g % à 100°C), mais très soluble dans l'alcool (14,5 g pour 100 cc d'alcool absolu) et dans le méthanol (12,90 g pour 100 cc) ainsi que dans l'acide acétique glacial, le dioxane, l'acétone, l'isopropanol, l'acétate de méthyle, le chlorure de méthylène, etc. La mauvaise solubilité dans l'eau et dans les liquides à faible degré alcoolique de l'acide sorbique en rendent son utilisation plus difficile dans les boissons, il y a été remédié par la mise sur le marché du sorbate de potassium, poudre blanche cristalline très soluble dans l'eau, puisque la préparation de solution concentrée à 40 p. 100 n'offre pas de difficulté. L'action microbiostatique du sorbate de potassium est un peu moins efficace que celle de l'acide sorbique, mais elle peut lui être rendue égale par une petite augmentation de la dose d'emploi. Il en est de même pour le sel de sodium.

Malgré sa mauvaise solubilité dans l'eau, l'acide sorbique est entraînable à la vapeur d'eau, propriété utilisée pour son extraction des denrées alimentaires en vue de son dosage.

b) Propriétés chimiques.

D'après Grignard (1) l'acide sorbique est oxydé par le permanganate de potassium en acides tartrique, oxalique, carbonique, et en aldéhyde acé-

tique. L'addition de brome donne des dérivés bromés surtout en γδ. De même le chlorure d'iode donne surtout l'acide δ iodo-γ chloro-β éthylacrylique.

$$CH_3 — CHI — CHCl — CH = CH — CO_2H$$

L'acide iodhydrique se fixe sur la double liaison la plus éloignée du groupe carboxyle, alors que l'acide bromhydrique se fixe sur les deux doubles liaisons et laisse un dérivé dibromé.

c) Propriétés conservatrices.

L'acide sorbique a suscité partout un grand intérêt depuis que MUELLER (2) et GOODING (3) ont signalé en 1939-1940 ses propriétés conservatrices. D'après ces auteurs, certains monoacides aliphatiques non saturés, ainsi que leurs sels et leurs esters, sont efficaces contre divers microorganismes, principalement les moisissures. Ils admettent comme partie active de la molécule la double liaison se situant en position α par rapport au groupe carboxyle.

La supériorité de l'acide sorbique sur les monoacides aliphatiques saturés, au point de vue de leur efficacité antiseptique serait due à une plus grande affinité du protoplaste bactérien pour les acides non saturés (4). L'action antiseptique de l'acide sorbique s'exerce plus particulièrement contre certaines bactéries et contre les moisissures. En plus de son action bactériostatique et fungistatique, il pourrait à doses plus élevées, agir comme fungicide (4). EMARD et VAUGHN (5) ont constaté une action sélective de l'acide sorbique contre les Actinomycètes, moisissures et levures catalase-positifs. Sur un milieu de culture renfermant de l'acide sorbique, seules les bactéries catalase-négatives, telles que bactéries lactiques et clostridies se développeront. On possède ainsi la possibilité d'enrichir une culture de microorganismes divers en bactéries lactiques et clostridies.

D'après les travaux récents de WHITAKER (6), l'action fungistique de l'acide sorbique s'expliquerait par son rôle inhibiteur des enzymes à groupement SH. WHITAKER ayant entrepris les premières recherches expérimentales pour élucider le mécanisme d'action de l'acide sorbique, a obtenu les résultats suivants : à la concentration de 10^{-4} m l'acide sorbique se révèle d'une efficacité comparable à celle de l'acide maléique pour l'inhibition des enzymes à SH : la ficine (protéinase végétale) et l'alcool-déshydrogénase de la levure. L'acide sorbique irradié aux rayons U. V. (forme cis-cis, ou forme cis-trans) se révèle plus efficace que les acides sorbiques du commerce non irradiés qui se présentent sous la forme trans-trans. Il est donc permis de supposer que le mécanisme de l'action inhibitrice de l'acide sorbique et des mono-acides aliphatiques semblables non saturés en αβ est comparable à celui de l'acide maléique. L'action fungistatique de l'acide sorbique paraît ainsi devoir être attribuée à l'inhibition de toute enzyme à SH d'origine microbienne.

L'acide sorbique arrête donc la prolifération des levures (*sacch. ellipsoïdus*, *sacch. oviformis*, etc.) (7) comme il stoppe celle des autres champignons, c'est pourquoi on a songé à l'utiliser en œnologie dans l'élaboration des vins blancs liquoreux en remplacement de l'anhydride sulfureux.

Pour l'utilisation efficace de l'acide sorbique, la concentration joue un rôle essentiel ainsi que l'ont vérifié plusieurs auteurs (4-8-9).

Dans les boissons alcooliques, son efficacité est fonction de la teneur en alcool, la circulaire du 15 octobre 1959 relative à l'emploi de l'acide sorbique en œnologie en tient compte et indique des doses décroissantes avec l'augmen-

tation du degré alcoolique du vin à traiter. Mais si ce fungistatique arrête bien le développement des levures ainsi que du *Mycoderma vini*, il n'empêche pas et même favorise plutôt la prolifération des bactéries acétiques, ainsi que des bactéries malolactiques (10-11).

L'efficacité absolue de l'acide sorbique non dissocié est cependant différente de celle des autres acides non dissociés. SCHELHORN (9) a montré que l'efficacité absolue de l'acide sorbique sur *Sacch. cerevisiae* et *Willia anomale* est à peu près identique à celle de l'acide benzoïque. Contre *Penicillium glaucum*, l'acide sorbique possède une efficacité double de celle de l'acide benzoïque, alors que contre *Streptobacterium plantarum*, elle n'est que moitié. Comparativement avec l'acide propionique, on trouve, par contre, une supériorité environ quadruple de l'acide sorbique (12).

Comparativement aux autres conservateurs, sa supériorité est due à ce que l'on arrive à une même efficacité absolue avec seulement le 1/4 ou le 1/5 de la dose de conservateur jusque-là nécessaire. C'est pourquoi il est actuellement de plus en plus utilisé autant pour la conservation des denrées alimentaires animales ou végétales que pour de nombreuses préparations pharmaceutiques (13).

Des essais physiologiques très poussés ont montré que l'acide sorbique était métabolisé correctement comme les acides gras ordinaires. CREMER et coll. (14) ont étudié récemment le comportement physiologique de l'acide sorbique sur les rats. Ils ont étudié plus particulièrement l'action physiologique comparée d'une addition à la ration de base des animaux en expérience, de 10 % d'acide sorbique, 10 % d'huile de maïs, 10 % de trioléine, 2 % d'huile de maïs + 8 % d'amidon, et 0,5 % de cholestérol. Ils n'ont pas constaté d'influence sur la croissance ; l'utilisation des différents corps gras est normale. Le cholestérol sanguin augmente pour tous les groupes, mais un peu plus pour l'acide sorbique. Leur conclusion est que l'acide sorbique se comporte comme un corps gras alimentaire et peut être qualifié de parfaitement inoffensif.

En conséquence des nombreux travaux physiologiques effectués, l'acide sorbique a été classé dans le groupe des agents pouvant être utilisés dans l'alimentation ; et en France, l'Académie de Médecine et le Conseil Supérieur d'Hygiène ont émis un avis favorable à son emploi en œnologie de préférence à l'anhydride sulfureux, seul antiseptique autorisé jusqu'ici.

III. — Méthodes de dosage de l'acide sorbique

Les différentes méthodes de dosage de l'acide sorbique utilisent en général les propriétés spécifiques dues à ses deux doubles liaisons : bande d'absorption spécifique dans l'U. V. ; fixation du chlorure d'iode ou du brome sur la molécule.

Cependant, il faut remarquer que plusieurs réactions qualitatives ou quantitatives ne sont pas spécifiques et appartiennent à de nombreux composés possédant un ou plusieurs atomes de C insaturés. Nous citerons par exemple :

— la coloration verte virant parfois au jaune brun signalée par POLVERINI (15), donnée par le benzol nitreux avec les doubles liaisons de nombreux composés : acides sorbique, crotonique, linoléique, oléique, ricinique, etc. ;

— la méthode qualitative par chromatographie sur papier de l'acide sorbique indiquée par BUCH et collaborateurs (16) : la pulvérisation de vanadate d'ammoniaque colore l'acide sorbique en jaune, mais plusieurs acides organiques donnent la même coloration ;

— l'utilisation par Eeckhaut (17) du réactif de Schiff pour caractériser l'acide sorbique après son oxydation en acétaldéhyde, ce réactif étant général des aldéhydes et des cétones.

a) Méthodes spectrophotométriques.

La méthode de base est celle mise au point par Melnick et Luckmann (18-19). Le principe de cette méthode repose sur le fait que les composés insaturés dont les doubles liaisons sont en position conjuguée présentent une absorption donnée dans la zone ultra-violette du spectre. On utilise la faculté que présente l'acide sorbique d'être facilement entraînable à la vapeur d'eau pour en effectuer une extraction facile des denrées alimentaires. On accroît encore cette propriété de l'acide sorbique en pratiquant l'entraînement en milieu riche en sulfate de magnésie, et acidifié vers pH 4,0.

On mesure ensuite l'absorption du distillat au spectrophotomètre. Il faut attirer l'attention sur le fait qu'une solution aqueuse d'acide sorbique possède deux maximum d'absorption dépendant du pH ; la solution au voisinage de la neutralité donne le maximum d'absorption à 256 mμ ; par acidification à pH 4,0, ce maximum est porté à 262 mμ. Diemair et Franzen (20) vérifièrent cette méthode, et après leurs recherches ils l'améliorèrent en la simplifiant. Ils pratiquent l'extraction de l'acide sorbique sur 50 cc de boisson (ou de solution de corps contenant l'acide sorbique) additionnée de 50 g de sulfate de magnésie et de 2 cc d'acide chlorhydrique à 25 %. La conclusion des travaux de ces derniers auteurs est que cette méthode est très sensible du fait du coefficient d'extraction élevé de l'acide sorbique et donne de très bons résultats lors du dosage en solution pure. Mais cette méthode serait beaucoup moins sûre pour le dosage de l'acide sorbique dans les milieux biologiques, car en plus de l'acide sorbique, on obtient dans le distillat d'autres substances entraînables à la vapeur d'eau qui montrent également une absorption dans les longueurs d'onde indiquées, et, par suite de la superposition des absorptions spécifiques et non spécifiques, il est impossible d'en déduire la teneur exacte en acide sorbique. Ce défaut peut être partiellement éliminé si l'on peut faire un à-blanc avec le même matériel exempt d'acide sorbique. Dans leurs analyses de diverses denrées alimentaires, Diemair et Franzen trouvèrent des absorptions non spécifiques de 5 à 26 % ; Melnick et Luckmann indiquent de leur côté : de 2 à 50 %. Le dosage quantitatif serait donc très difficile par cette méthode, notre laboratoire ne disposant pas de spectrophotomètre nous n'avons pu le vérifier.

Hardon et Visser (21) ont également remarqué qu'au cours de la distillation de l'acide sorbique, le milieu étant porté à environ 135°, une décomposition du matériel analysé se produit en donnant des composés volatils organiques également insaturés, et que ces substances indésirables, d'autant plus abondantes que le milieu est riche en sucres, montrent une forte absorption de la lumière à 260 mμ. Pour éliminer ces impuretés, les auteurs déplacent l'acide sorbique par entraînement à la vapeur d'eau, ils alcalinisent le distillat (200 cc environ) à la soude et le concentrent à environ 50 cc. Puis ils font passer le concentrat dans une fiole jaugée de 500 cc, amènent le pH à 4,8 par addition d'acide sulfurique et mesurent sur une dilution l'absorption au spectrophotomètre. D'après les résultats de leurs travaux, la correction à apporter à la mesure est si faible qu'elle peut être négligée.

Enfin, en France, Peynaud (22) indique une méthode spectrophotomé-

trique — reproduite dans l'article de M. FLORENTIN (11) — qui est très comparable à celle des auteurs précédents.

b) **Méthodes chromatographiques.**

La chromatographie présente l'avantage d'être plus sensible que les autres méthodes, ce qui lui permet de déceler des quantités d'acide sorbique de l'ordre du milligramme, alors que les méthodes précédentes nécessitent une correction plus ou moins importante, correspondant par exemple d'après PEYNAUD à une vingtaine de milligrammes par litre.

Par contre les méthodes de dosage chromatographiques de l'acide sorbique pèchent généralement par leur spécificité insuffisante.

Rappelons la méthode de détection au vanadate d'ammoniaque de BUCH (16), où de nombreux acides organiques se colorent en jaune comme l'acide sorbique, et qui permet de déceler jusqu'à 0,15 mg de ce conservateur.

Également la méthode proposée par EECKHAUT (17) pour détecter l'acide sorbique dans les boissons, qui permettrait d'en déceler jusqu'à environ 3 mg, mais dont la spécificité est également douteuse puisqu'elle utilise le réactif de Schiff.

DREWS (23) propose une méthode chromatographique très sensible, puisque la réaction est encore décelable pour 60 µg d'acide sorbique. Cette méthode est basée sur la coloration rouge produite par pulvérisation de la base de FISCHER sur le chromatogramme. Mais cette réaction n'est pas rigoureusement spécifique car la nipagine donne aussi la même coloration ; on peut améliorer la spécificité par une pulvérisation ultérieure d'une solution de soude ammoniacale : la zone de la nipagine se colore encore en rouge intense, alors que la tache d'acide sorbique apparaît rougeâtre avec une pointe de bleu violacé. Mais la différence de coloration n'est pas suffisamment marquante pour une utilisation quantitative de cette réaction.

Enfin ROSENTHALER (24) indique également deux méthodes susceptibles de servir à la détection de l'acide sorbique, reposant sur les réactions de ce corps avec l'acide p-phénylhydrazine sulfonique et avec l'acide p-diazobenzosulfonique. Ces deux méthodes sont insuffisantes pour un dosage quantitatif car elles ne sont pas spécifiques et ne possèdent qu'une faible sensibilité.

c) **Méthodes colorimétriques.**

La colorimétrie a l'avantage sur les méthodes précédentes de ne nécessiter qu'un appareillage limité, existant dans tous les laboratoires de recherches et dans de nombreux laboratoires industriels.

C'est pourquoi nous nous sommes surtout intéressés à cette technique. HARDON et VISSER (21) proposèrent en 1958, en plus de leur méthode spectrophotométrique, deux techniques de dosage colorimétrique.

1° *Méthode à l'hydroquinone.*

La première est basée sur la coloration obtenue à chaud par l'action de l'hydroquinone sur différents acides organiques en milieu sulfurique. Dans ces conditions l'acide sorbique donne un produit coloré en jaune qui est soluble dans le chlorure de méthylène et le benzol, d'où on l'extrait par agitation avec une solution de soude. Il passe alors quantitativement dans la phase aqueuse

alcaline en virant au vert. Cette solution possède une absorption maxima pour une longueur d'onde de 710 mμ.

D'après les auteurs l'utilisation de cette technique est limitée car il n'y a proportionalité entre l'extraction et la concentration que dans une zone assez étroite de 5 à 15 mg d'acide sorbique. Cependant cette méthode paraît assez spécifique car les conservateurs couramment utilisés et entraînables à la vapeur (acides benzoïque et salicylique) ne développent aucune coloration et les essais à blanc sur les aliments analysés donnent des réactions parfaitement incolores. Cette méthode serait donc particulièrement intéressante pour l'analyse qualitative.

2° *Méthode colorimétrique au monochlorure d'iode.*

En 1927, BOESEKEN et GELBER (25) décrivirent une réaction que l'on peut considérer comme spécifique des doubles liaisons conjuguées, et à laquelle on n'avait jusqu'ici accordé que bien peu d'attention. Ces chercheurs faisant agir une solution de monochlorure d'iode sur des acides gras à doubles liaisons conjuguées observèrent une précipitation d'iode. Le monochlorure d'iode réagirait d'après le principe de THIELE avec les atomes de carbone en position 1-4, qui accepteraient le chlore avec libération d'iode. En solution diluée, cette réaction est très lente et n'atteint son terme qu'après plusieurs jours. Mais si l'on fixe la durée de réaction à un temps déterminé, la quantité d'iode alors libérée peut servir de mesure aux substances comportant une double liaison présentes dans la solution. Un dosage quantitatif d'acide sorbique paraît donc possible d'après cette théorie. Mais pour que la réaction se déroule favorablement, il est nécessaire de l'effectuer en milieu complètement privé d'eau. Dans ce but, on fait passer l'acide sorbique dans un solvant organique : le chlorure de méthylène, et le chlorure d'iode est utilisé en solution dans l'acide acétique glacial.

MODE OPÉRATOIRE

Pour obtenir une solution débarrassée de tous éléments perturbateurs, on extrait l'acide sorbique des denrées alimentaires par entraînement à la vapeur d'eau. Cette technique d'isolement est la meilleure et peut être utilisée avec toutes les denrées : boissons, produits laitiers, confiseries, pâtisseries etc...

a) *Réactifs nécessaires* :

— Acide citrique pur cristallisé.
— Sulfate de magnésie pur cristallisé.
— Solution de soude à 10 p. 100.
— Solution d'acide sulfurique à 10 p. 100.
— Eau oxygénée à 10 volumes.
— Chlorure de méthylène pur.
— Sulfate de sodium anhydre pur.
— Solution de monochlorure d'iode à 16,25 g. par litre dans l'acide acétique glacial.

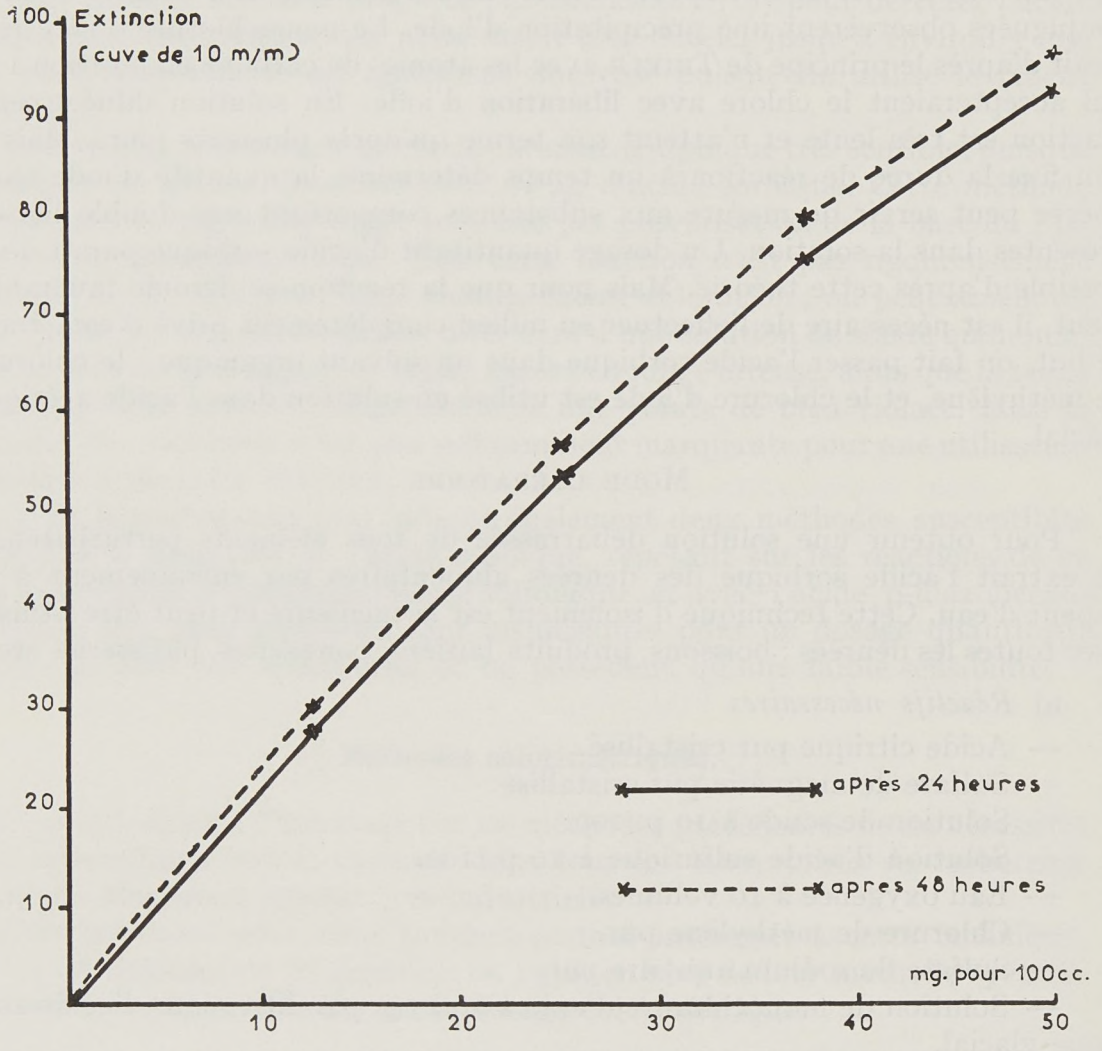
b) *Extraction de l'acide sorbique.*

Elle s'opère sur une prise d'échantillon contenant de 5 à 50 mg d'acide sorbique. Pour les boissons, cidres et vins, jus de fruit, nous sommes partis d'un volume de 50 cc ou de 100 cc, selon la teneur présumée en acide sorbique. L'échantillon est introduit dans le ballon d'un appareil à distiller par entraînement à la vapeur d'eau, ou plus simplement dans un ballon à distiller ordinaire

relié d'une part à un ballon générateur de vapeur et de l'autre à un réfrigérant à fort rendement. On ajoute à la prise d'essai 2 à 3 g d'acide citrique et 50 g de sulfate de magnésie pour 50 cc de volume originel, on distille 200 cc que l'on recueille dans un bécher contenant 2 cc de lessive de soude à 10 p. 100. Le distillat est alors concentré par ébullition, à environ 50 cc que l'on introduit dans une ampoule à décanter, on acidifie avec 2 cc d'acide sulfurique à 10 p. 100, ajoute 5 cc d'eau oxygénée, puis on extrait l'acide sorbique par trois agitations successives de la solution avec chaque fois 25 cc de chlorure de méthylène. Après chaque extraction, le solvant est rassemblé dans une fiole jaugée de 100 cc. On ajoute alors du sulfate de soude anhydre pour déshydrater le solvant, puis on complète au trait par addition de chlorure de méthylène.

c) *Colorimétrie de l'acide sorbique.*

On prélève 8 cc de la solution d'acide sorbique dans le chlorure de méthylène et les introduit dans un tube à essai de 20/200 bouché à émeri, on ajoute



Courbe étalon de l'Acide Sorbique avec le Chlorure d'Iode (Lumétron-filtre 515 M).

2 cc de la solution de monochlorure d'iode, mélange soigneusement par agitation et abandonne le tube au repos pendant 24 heures à la température du laboratoire, mais à l'obscurité, pour laisser s'opérer la réaction de fixation du chlore sur l'acide sorbique. Après ce temps on mesure l'absorption de la solution au colorimètre, cette absorption est maximum pour une longueur d'onde de

520 m μ. On utilise comme témoin un tube préparé avec 8 cc de chlorure de méthylène et 2 cc de la solution de chlorure d'iode.

On établit de même une courbe étalon à l'aide d'une solution d'acide sorbique dans le chlorure de méthylène. Les valeurs obtenues avec des solutions de chlorure de méthylène additionnées de quantités connues d'acide sorbique donnent une relation linéaire entre la concentration en acide sorbique et l'extinction de la solution ; au moins jusqu'à 50 mg pour 100 cc.

d) *Application aux boissons.*

Les premiers résultats que nous avons obtenus en suivant la méthode indiquée par HARDON et VISSER ne furent pas satisfaisants avec les cidres et jus de pommes, de même qu'avec du vin rosé d'Anjou. Nous obtenions des résultats trop élevés, et les témoins sans acide sorbique paraissaient donner des teneurs d'autant plus élevées que le volume de distillat recueilli était plus important. Nous en avons donc conclu qu'au cours de la distillation des boissons contenant des sucres, il se formait des composés volatils réagissant sur le chlorure d'iode, comme SPANYAR et SANDOR (26) l'indiquent dans leur travail où ils constatent également la présence de substances consommant du brome, mais pouvant être éliminées par un traitement à l'eau oxygénée.

Nous avons alors complété le mode opératoire indiqué par HARDON et VISSER en opérant l'extraction au chlorure de méthylène en présence d'eau oxygénée. Cette petite modification nous a permis d'obtenir des résultats très corrects, même en opérant sur des jus de pommes ou de poires concentrés et en distillant un volume double (400 cc) de celui indiqué.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus en pratiquant l'extraction avec et sans eau oxygénée.

TABLEAU I

	Extraction			
	Sans eau oxygénée		Avec eau oxygénée	
	Acide sorbique trouvé		Acide sorbique trouvé	
	mg	mg/litre	mg	mg/litre
1. Concentré de jus de pommes naturel				
distillat 200 cc	3,75	75	0,25	5
distillat 200 cc supplémentaires	10	200	0	0
2. Concentré de jus de pommes + 25 mg Acide sorbique (500 mg/litre)				
distillat 200 cc	28,5	570	26	520
distillat 200 cc supplémentaires	6,5	130	0,05	1,0
3. Concentré de jus de poires nature				
distillat 200 cc	3,0	60	0,3	6,0
distillat 200 cc supplémentaires	15,5	310	0,2	4,0
4. Cidre naturel	5	100	0	0
5. Vin rosé naturel	1,85	37	0	0

En milieu sucré, on obtient généralement (avec traitement par H_2O_2) des résultats approchés par excès à 4-6 p. 100 ; alors que sans H_2O_2 on peut obtenir des erreurs en plus dépassant 200 mg par litre, si l'on poursuit trop longtemps la distillation.

La courbe étalon obtenue avec les solutions pures d'acide sorbique de 0 à 50 mg pour 100 cc montre que jusqu'aux environs de 30 mg pour 100 cc la loi de BEER est bien respectée, surtout si on attend 48 heures pour colorimétrer. Cette méthode paraît donc très satisfaisante, surtout pour les petites doses d'acide sorbique autorisées en œnologie, puisque en suivant à la lettre la technique opératoire, si l'on est parti d'une prise d'échantillon de 50 cc, une teneur finale de 25 mg pour 100 correspond à une dose initiale de 25 × 20 = 500 mg/litre, double de la teneur maxima autorisée. La méthode permettant une précision de 5 p. 100, généralement en plus, elle nous semble pouvoir être recommandée dans les laboratoires travaillant sur les boissons, et particulièrement en œnologie.

3° *Méthode colorimétrique au Benzothiazol.*

DIEMAIR et FRANZEN (20) ayant montré, comme nous l'avons rapporté précédemment, que la méthode spectrophotométrique de MELNICK et LUCKMANN ne permettait pas un dosage quantitatif de l'acide sorbique dans les milieux biologiques malgré les améliorations apportées, ont orienté leurs travaux sur la recherche d'une réaction spécifique de l'acide sorbique pouvant être utilisée en colorimétrie. Ils constatèrent ainsi que l'acide sorbique réagissait à chaud avec le 2-méthyl-mercapto-benzothiazol-p-éthyltoluolsulfonate (benzothiazol ou B.T.) et l'anhydride acétique pour former un composé coloré. Par chauffage avec l'anhydride acétique, l'acide sorbique est transformé en anhydride sorbique qui réagit avec le B.T. pour former un composé vert (27).

MODE OPÉRATOIRE.

L'acide sorbique est d'abord extrait par entraînement à la vapeur d'eau dans les mêmes conditions que pour les méthodes précédentes. La prise d'échantillon est calculée de façon à renfermer de 3 à 5 mg d'acide sorbique. On recueille environ 100 cc de distillat, que l'on acidifie avec 2-3 gouttes d'HCl et on extrait l'acide sorbique par 5 traitements successifs avec 20 cc d'éther. L'éther est ensuite desséché par environ 5 g d'anhydride phosphorique. On évapore ensuite l'éther sous vide, ajoute au résidu sec 5 cc d'anhydride acétique, et filtre si nécessaire. On introduit alors dans un tube à essai :

— 30 mg de B.T. desséché, à froid à l'exsicateur,
— 50 mg d'acétate de sodium anhydre,
— et 1 cc du filtrat précédent.

Le tube à essai est alors plongé pendant 15 minutes au bain d'huile à 135°C. Après refroidissement du tube, la solution est amenée à un volume final de 11 cc par addition de 10 cc de méthanol, on agite vivement, refroidit le tube dans l'eau, puis après 15 minutes de repos on colorimètre à longueur d'onde : 652 mμ.

La courbe étalon montre une relation parfaitement linéaire entre l'extinction et la teneur en acide sorbique, pour des concentrations de 0,1 à 1,2 mg d'acide sorbique dans 11 cc de solution.

Cette méthode serait très spécifique, d'après les auteurs, aucun des conservateurs utilisés habituellement ne donne la coloration vert foncé de l'acide sorbique, mais la coloration jaune ambrée de l'essai à blanc.

Cette méthode pourra être vérifiée sur les boissons qui nous intéressent lorsque le réactif spécifique sera commercialisé en France. Dans leur publica-

tion les auteurs ne font pas état de dosages effectués sur les divers produits alimentaires, il est donc impossible de comparer la sensibilité et la précision de cette méthode avec les autres indiquées précédemment.

4° *Méthode colorimétrique à l'acide thiobarbiturique.*

Cette méthode indiquée par le Dr SCHMIDT (28) est basée sur la coloration rouge donnée par l'acide thiobarbiturique avec les produits aldéhydiques obtenus par oxydation à chaud de l'acide sorbique par le bichromate de potassium en milieu acide minéral. Dans ces conditions de réaction l'acide sorbique s'oxyde en donnant de l'oxyacroléine et du dialdéhyde malonique, avec un rendement reproductible. Les deux aldéhydes tautomères donnent avec l'acide thiobarbiturique une coloration rouge dont le maximum d'absorption en solution aqueuse acide est de 532 mμ (29-30). Une méthode de dosage qualitatif et quantitatif basée sur cette technique se révélerait aussi sensible et spécifique que celle de MELNICK et LUCKMANN. Cette méthode présenterait l'avantage de ne nécessiter qu'un colorimètre pour mesurer l'extinction. La courbe obtenue avec des concentrations connues d'acide sorbique est une droite, et permet des dosages quantitatifs de 1 à 20 μg d'acide sorbique par cc.

Si l'on ne dispose pas de colorimètre, on peut encore estimer à l'œil nu, l'intensité de la coloration rouge et, par là, la concentration en acide sorbique en s'aidant d'une série de solutions témoins étalonnées à des concentrations connues en acide sorbique.

L'auteur doit ultérieurement décrire sa méthode détaillée. D'après une correspondance personnelle, le Dr SCHMIDT m'informa que dans sa forme actuelle sa méthode n'était pas applicable aux boissons alcooliques, qu'elle n'était encore que qualitative et qu'il poursuivait ses recherches pour la rendre utilisable à un dosage quantitatif de l'acide sorbique dans les vins blancs.

D'après cette même correspondance personnelle, le Dr SCHMIDT signale la méthode suivante de détection de l'acide sorbique dans les vins blancs :

— Dans un long tube à essai, introduire 2 cc de vin blanc, y ajouter 1 cc de SO_4H_2 N/1 et 4 à 5 cc de solution N/10 de bichromate de potassium. On chauffe le tube pendant 1 minute à faible ébullition, ou bien on le plonge pendant 5 minutes au bain-marie bouillant. On ajoute alors 2 cc de solution aqueuse d'acide thiobarbiturique à 0,2 p. 100 et chauffe le tube pendant 2 minutes à douce ébullition ou le plonge pendant 10 minutes au bain-marie bouillant. La présence d'acide sorbique est décelée par une coloration rouge vineux.

d) **Méthode chimique.**

Devant l'emploi de plus en plus fréquent de l'acide sorbique en industrie alimentaire, SPANYAR et SANDOR (26) ont publié récemment une méthode d'analyse quantitative simple et rapide ne nécessitant aucun appareillage coûteux et pouvant donc être effectuée par n'importe quel laboratoire industriel.

Principe de la méthode.

La méthode est basée sur le fait qu'étant un acide gras insaturé à deux doubles liaisons, l'acide sorbique fixe le brome, même en solution aqueuse, et que la quantité de brome fixée est proportionnelle, dans les limites de concentration déterminées, à la quantité d'acide sorbique présent.

On obtient des résultats très convenables lorsque la quantité d'acide sorbique est comprise entre 2 et 10 mg. La réaction s'effectue en milieu acide à température ordinaire, mais à l'obscurité ; dans ces conditions, elle est reproductible, et, connaissant d'une part la quantité de brome ajouté au départ et d'autre part la quantité de brome restant (déterminée par iodométrie) on en déduit la quantité de brome fixé d'où la teneur en acide sorbique.

Mode opératoire.

1° *Extraction de l'acide sorbique.*

Pour extraire l'acide sorbique des produits végétaux, jus de fruits et de légumes, les auteurs recommandent une extraction à l'éther sulfurique en milieu acide et en présence d'eau oxygénée.

S'il s'agit de produits laitiers ou boulangers, les auteurs emploient l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, selon la technique préconisée ultérieurement.

D'après nos expériences personnelles, l'extraction à l'éther sulfurique ne nous a pas donné de résultats satisfaisants, une extraction en trois temps ne nous a permis d'obtenir que 70 à 80 p. 100 de la dose totale d'acide sorbique mise en jeu.

Par contre l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau permet d'obtenir sur solution pure un rendement sensiblement constant de 95 p. 100, comme sur cidre et vin additionné de conservateur. Mais il faut signaler que la boisson, cidre ou vin exempte d'acide sorbique révèle par extraction à la vapeur d'eau une action perturbatrice de produits volatils oxydant la solution de brome et correspondant à une quantité d'acide sorbique légèrement inférieure à 1 mg pour la prise d'essai.

Dans le cas d'addition d'acide sorbique très faible, cette méthode livrerait donc des résultats entachés d'erreur par excès, une correction pouvant être apportée au résultat obtenu, mais à condition de disposer du même produit sans acide sorbique.

Nous préférons donc utiliser la méthode d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, telle qu'elle a été décrite ci-dessus dans la méthode colorimétrique au chlorure d'iode. On partira généralement d'un volume de 50 cc, ayant intérêt à ce que la prise d'essai ne renferme pas plus de 10 mg d'acide sorbique et on recueille environ 200 cc de distillat.

2° *Dosage de l'acide sorbique.*

Réactifs nécessaires :

— Solution de bromate de potassium N/50, 0, 556 g/litre.
— Solution de thiosulfate de sodium N/50, 4,96 g/litre.
— Solution de bromure de potassium à 10 p. 100.
— Solution de iodure de potassium à 10 p. 100.
— Empois d'amidon à 1 p. 100, ou thiodène.
— Acide sulfurique dilué au 1/2.

Le distillat contenant l'acide sorbique est introduit dans une fiole bouchée émeri. On y ajoute : selon la dose présumée d'acide sorbique 20 ou 25 cc de la solution N/50 de bromate de potassium, 5 cc de bromure de potassium et 12 cc d'acide sulfurique au 1/2. La fiole bouchée est placée à l'obscurité pendant 15 à 30 minutes. On ajoute alors 5 cc d'iodure de potassium et titre l'excès d'iode

à l'hyposulfite de soude N/50 d'abord jusqu'à coloration jaune pâle, puis jusqu'à décoloration complète après avoir ajouté 1 cc d'empois d'amidon ou une pincée de thiodène. La différence entre le volume de la solution de bromate et celui de la solution d'hyposulfite consommé donne le volume de bromate équivalant à l'acide sorbique présent ; sachant que 1 cc de bromate N/50 correspond à 0,7 mg d'acide sorbique, il est facile de calculer la teneur de la boisson analysée en acide sorbique.

Le principe du dosage bromométrique repose sur la méthode de KOPPESCHAR (31) selon laquelle la liqueur titrée de brome est une solution contenant un mélange de bromure en excès et de bromate en quantité exactement connue. En ajoutant de l'acide sulfurique à ce mélange, on en libère le brome suivant l'équation :

$$BrO_3K + 5\,KBr + 3\,SO_4H_2 = 3\,SO_4K_2 + 3\,H_2O + 6\,Br$$

Le brome en excès, non fixé par l'acide sorbique décompose l'iodure de potassium ajouté dans la deuxième phase de l'opération, pour reformer du bromure de potassium en libérant l'iode atome pour atome, ce dernier étant titré par la solution d'hyposulfite.

Le tableau suivant résume les résultats que nous avons obtenus sur cidre et sur vin par cette méthode.

TABLEAU II

Dosage de l'acide sorbique au bromate de potassium après extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

Échantillon analysé	Acide sorbique ajouté en mg	Acide sorbique trouvé en mg	Acide sorbique en mg par litre	Erreur %
1-50 cc de cidre	0	2,1	42	
2-50 cc de cidre	0	1,89	37,8	
3-50 cc de cidre	0	0,91	18,3	
4-50 cc de cidre	10	10,36	207,2	+ 3,6
5-50 cc de cidre	10	10,85	217	+ 8,5
6-50 cc de cidre	10	11,41	228,2	+ 14,1
7-50 cc vin rosé	0	1,05	21,0	
8-50 cc vin rosé	0	0,945	18,9	
9-50 cc vin rosé	10	9,87	197,4	— 1,3
10-50 cc vin rosé	10	9,80	196,0	— 2,0
11-50 cc vin rosé	10	11,515	230,3	+ 15,15

On peut remarquer que les substances volatiles fixant le brome correspondent avec cette méthode à des quantités d'acide sorbique de l'ordre de 1 mg pour 50 cc des vins étudiés, soit environ 20 mg/litre.

Pour les cidres les résultats sont encore moins satisfaisants, puisque l'on obtient une équivalence en acide sorbique variant de 0,9 à 2,1 mg d'acide sorbique pour 50 cc soit de 18 à 42 mg par litre.

Pour les boissons additionnées d'acide sorbique à des doses correspondant à 200 mg/litre, les quantités retrouvées ont été constamment plus élevées que la dose ajoutée ; pour les cidres, l'erreur par excès variant de 3,6 à 14,1 p. 100.

Pour les vins l'erreur est également du même ordre, elle varie de — 2,0 p. 100 à + 15,1 p. 100.

Parmi les conservateurs les plus généralement utilisés, l'acide benzoïque, l'acide formique et l'anhydride sulfureux ne perturbent pas ce dosage. Seul

l'acide salicylique se combine au brome, la réaction est alors décelable par un dégagement de gaz carbonique et la turbidité de la solution. Il y a alors formation de tribromophénol. Dans ce cas il y aurait alors une correction à apporter au dosage bromométrique après dosage séparé de l'acide salicylique.

IV. — Conclusions

Parmi les différentes méthodes passées en revue dans cet article, nous éviterons de discuter de la méthode spectrophotométrique de MELNICK et LUCKMANN et de ses variantes, nous nous contenterons de rappeler que DIEMAIR et FRANZEN concluent que si cette méthode est très sensible et précise pour le dosage de l'acide sorbique en solutions pures, elle est beaucoup moins appropriée à son dosage dans les milieux biologiques du fait de la présence dans le distillat analysé d'autres substances volatiles dotées également d'une certaine absorption aux mêmes longueurs d'onde que l'acide sorbique, mais que ce défaut peut être partiellement surmonté si l'on peut effectuer une lecture à-blanc avec le même produit exempt d'acide sorbique. La correction est d'autant plus importante que la matière analysée est plus riche en sucres ou en hydrates de carbone, et peut dépasser dans ce cas 40 p. 100 de la teneur en acide sorbique d'après DIEMAIR et FRANZEN ainsi que d'après HARDON et VISSER.

Les méthodes utilisant la chromatographie sur papier nous paraissent plutôt qualitatives que quantitatives. De plus elles ne sont guère praticables dans les laboratoires de contrôle, au même titre que la méthode spectrophotométrique.

La méthode chimique de SPANYAR et SANDOR donne d'excellents résultats sur des solutions pures, mais présente, elle aussi, le même défaut que la spectrophotométrie, d'être influencée par la présence de substances entraînables à la vapeur d'eau et susceptibles de fixer une partie du brome. De sorte que là aussi, il serait nécessaire de pratiquer un à-blanc sur le même matériel exempt d'acide sorbique. Ainsi corrigée, cette méthode est séduisante par la grande simplicité de manipulation et son peu d'exigence en équipement qui lui donnent l'avantage de pouvoir être pratiquée dans tous les laboratoires.

Enfin la meilleure solution nous semble être apportée par les méthodes colorimétriques. La méthode de HARDON et VISSER au chlorure d'iode s'est révélée très satisfaisante en pratiquant l'extraction de l'acide sorbique au chlorure de méthylène en présence d'eau oxygénée. Même en milieu très sucré (plus de 100 g au litre) on obtient encore des résultats ne s'écartant pas de plus de 5 p. 100 de la teneur réelle en acide sorbique.

Les autres méthodes colorimétriques que nous avons indiquées, celle de DIEMAIR et FRANZEN ainsi que celle de SCHMIDT se révèleront peut-être à l'essai encore plus spécifiques de l'acide sorbique et ne soulèveront plus alors aucune objection. D'après leurs auteurs, elles sont excellentes en solutions pures, il reste à les adapter aux conditions de dosages rencontrées par les laboratoires œnologiques et cidricoles.

Cependant, par entraînement à la vapeur, méthode d'extraction la plus commode, le rendement n'est jamais parfait et ne dépasse guère, dans les meilleures conditions, 95 p. 100. La meilleure méthode de dosage ne peut donc donner mieux que des résultats approchés à 5 p. 100. Cette limite peut d'ailleurs être considérée comme satisfaisante, car l'apport d'acide sorbique doit être relativement important pour être efficace, en moyenne de 150 à 200 mg par litre en

œnologie, une erreur relative de 5 p. 100 sur ces doses moyennes ne dépasse donc pas 10 mg ; il est donc possible d'admettre une tolérance de cet ordre afin de tenir compte de l'imperfection des méthodes de dosage actuelles.

Nous éviterons de prendre parti sur l'utilité de l'acide sorbique en œnologie. Ce n'était pas le but de ce travail, plusieurs œnologues qualifiés ont d'ailleurs pris position sur cette question. Elle est d'ailleurs résolue, au moins provisoirement puisque la circulaire du 15 octobre 1959 a autorisé l'emploi de ce conservateur pour l'élaboration des vins moelleux.

Nous nous contenterons d'attirer l'attention des techniciens et des professionnels de la cidrerie sur les conditions d'efficacité de l'acide sorbique. Ce conservateur n'exerce une action fungistatique à la dose maxima autorisée, qu'en présence d'une teneur en alcool de l'ordre de 10°. A cette dose maxima, une addition d'acide sorbique aux cidres doux ou aux jus de pommes restera donc sans effet pour le développement des levures puisqu'on s'adresse à des boissons exemptes d'alcool ou à degré alcoolique inférieur à 3°. La meilleure technique de fabrication de ces produits reste donc toujours la pasteurisation, à la seule condition d'être utilisée rationnellement, c'est-à-dire dans des conditions de durée et de température bien définies pour être efficaces sans nuire aux qualités gustatives des produits élaborés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Grignard (V.). — Traité de Chimie Organique, **9**, 458. Masson et Cie, Paris 1948.

(2) Mueller (E.). — D. R. Patent 88. 1299 du 3-9-1939.

(3) Gooding (C. M.). — U.S. Patent 2. 379-294 du 26-2-1940.

(4) Melnick (D.), Luckmann (F. H.) and Gooding (C. M.). — Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. *Food*, **19**, 44, 1954.

(5) Émard (L. O.) and Vaughn (R. H.). — Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic acid bacteria and clostridia. *J. Bacteriol.*, **63**, 4, 487-494, 1952.

(6) Whitaker (J. R.). — Inhibition of sulphydryl enzymes with sorbic acid. *Food Res.*, **24**, 37-43, 1959.

(7) Barret (A.) et Bidan (P.). — L'acide sorbique. *Vignes et Vins*, **85**, 8-14, 1960.

Peynaud (E.). — L'emploi de l'acide sorbique dans la conservation des vins. *Vignes et Vins*, **85**, 15-17, 1960.

(8) Raible (K.). — Ueber den Einfluss unterschwelliger Konzentrationen von Benzoesäure, Sorbinsäure und Salicylsäure auf die Vermehrung und den Stoffwechsel einigen Arten von Bakterien und Hefe. *Fette, Seifen, Anstrichm. Dtsch.*, **60**, 10, 953-957, 1958 et *Dtsch. Lebensmittel Rdsch.*, **53**, 60, 155, 1957.

(9) Von Schelhorn (M.). — Zur Frage der Wirksamkeit und richtiger Anwendung von chemischen Konsiervierungsmitteln in der Lebensmittelindustrie. *Dtsch. Lebensmitt. Rdsch.*, **44**, 7, 144, 1948.

— Wirksamkeit und Wirkungsbereich chemischer Konservierungsmittel für Lebensmittel. *Zeitsch. Lebensmitt. Unters. Forsch.* **92**, 4,256-266, 1951. et *Dtsch. Lebensmittel Rdsch.*, **46**, 151, 1950.

— Stand der Konservierungsmittel-Forschung. *Fette, Seifen, Dtsch.*, **3**, 6, 131-134, 1954 et *Dtsch. Lebensmittel Rdsch.*, **50**, 267, 1954.

(10) Baillot d'Estivaux (L.). — L'acide sorbique dans la conservation des vins. *Ann. Falsif. Fraudes.*, **604**, 149, 1959.

(11) Florentin (D.). — Emploi de l'acide sorbique en alimentation. *Ann. Falsif. Fraudes.*, **612**, 454, 1959.

(12) MELNICK (D.), VAHLTEICH (H. W.) und HACKETT (A.). — Sorbic acid as a fungistatic agent for foods XI. Effectiveness of sorbic acid in protecting cakes. *Food Res.*, **21,** 133, 1956.
(13) FRANZEN (K.). — Inaugural Diss. Frankfurt a. Main, 1958.
(14) CREMER (H. D.), TOLCKMITT (W.) und VENDERHOLD (J.). — Beitrag zur Physiologie der Sorbinsäure. *Klin. Wsch.*, **37,** 104, 1959.
(15) POLVERINI (A.). — *Gazz. Chim. ital.*, **64,** 409, 1934.
(16) BUCH (M. L.), MONTGOMERY (R.) and PORTER (W. L.). — Identification of organic acids on paper chromatograms. *Analyt. Chemistry,* U.S.A. **24,** 489, 1952.
(17) EECKHAUT (R. G.). — Un nouvel antiseptique, l'acide sorbique et sa recherche dans les boissons. *Fermentatio* (Belg.), **3,** 136-142, 1955.
(18) MELNICK (D) and LUCKMANN (F. H.). — Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. III — Spectrophotometric determination of sorbic acid in cheese and in cheese wrappers. *Food. Res.*, **19**, 1, 20-27 et 28-32, 1954.
(19) LUCKMANN (F. H.) and MELNICK (D.). — Sorbic acid as a fungistatic agent for foods X. Spectrophotometric determination of sorbic acid in foods in general. *Food Res.*, **20,** 6, 649-654, 1955.
(20) DIEMAIR (W.) ùnd FRANZEN (K.). — Zur Analytik der Sorbinsäure. I Teil. *Fresenius Zeitsch. Analyt. Chem.*, **166,** 4, 246-253, 1959.
(21) HARDON (H. J.) ùnd VISSER (D.). — Colorimetrische Methoden zur Bestimmung von Sorbinsäure. *Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch.*, **108,** 5, 397-402, 1958.
(22) PEYNAUD (E.) d'après FLORENTIN (D.). — Emploi de l'acide sorbique en alimentation. *Ann. Falsif. Fraudes,* **612,** 454, 1959.
(23) DREWS (E.). — *Brot und Geback,* **9,** 81, 1955.
(24) ROSENTHALER (L.). — Beitrag zum Nachweis organischer Verbindungen. *Pharm. Acta Helvet.*, **31,** 1, 52-56, 1956.
(25) BOESEKEN (J.) und GELBER (E. TH.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas,* **46,** 158, 1927.
(26) SPANYAR (P.) und SANDOR (A.). — Bestimmung von Sorbinsäure in Lebensmittel. *Zeitsch. Lebensm. Unters. Forsch.*, 108, 5, 402-405 1958.
(27) DIEMAIR (W.) und FRANZEN (K.). — Zur Analytik der Sorbinsäure. II Teil. *Fresenius Zeitsch. Analyt. Chem.*, **166,** 5, 325-333, 1959.
(28) SCHMIDT (H.). — Empfindliche Methode für Bestimmung von Sorbinsäure. *Die Naturwissenschaften,* **13,** 425, 1959.
(29) SINNHUBER (R. O.), YU (T. C.) and YU (TE CHANG YU). — Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxydative rancidity. *Food Res.*, **23,** 6, 626-634, 1958.
(30) SCHMIDT (H.). — Die Thiobarbitursäurezahl als Mass für den Oxydationsgrad von Nahrungsfetten. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **61,** 2, 127-133, 1959.
(31) KOPPESCHAR d'après MATHIEU (H.). — Analyse chimique, **II**, 635, Masson et Cie, 1934.

APPAREIL PERMETTANT LA POSE FACILE ET LE SÉCHAGE RAPIDE ET SIMULTANÉ DE PLUSIEURS TACHES OU BANDES DE DÉPART SUR LES CHROMATOGRAMMES

PAR

L. DEIBNER et M. BOURZEIX

avec la collaboration technique de **A. MARY**

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Antériorités.

III. — Recherches personnelles

A — Appareil facilitant la pose et le séchage des taches ou des bandes de départ sur les chromatogrammes.

a) Principe de l'appareil.

b) Description :

1) Cadre à tubes de verre ;

2) Dispositif de fixation des chromatogrammes ;

3) Source de courant d'air ; sa distribution.

B — Etude de l'utilisation de l'appareil.

a) Mode opératoire.

b) Essais de différentes micropipettes ;

c) Efficacité de l'appareillage ;

IV. — Conclusion.

Résumé.

Références bibliographiques.

I. — Introduction

Apparemment la réussite de la chromatographie de partage sur papier devrait en principe dépendre de plusieurs facteurs. Pourtant BLOCK, DURRUM et ZWEIG (1) considèrent le mode de formation convenable des taches ou des bandes sur le papier comme le facteur le plus important et probablement le seul important de cette réussite.

Quoi qu'il en soit, l'application correcte des liquides à chromatographier sur papier est tributaire d'abord de la possibilité d'étaler les feuilles de papier sur une surface neutre garantissant leur intégrité chromatographique par l'absence de tout contact indésirable ; elle dépend ensuite des moyens d'immobiliser les feuilles pendant toutes les opérations et enfin de la facilité de la pose de taches de départ et, ce qui est très important, de la rapidité et de la stimultanéité de leur séchage.

L'ensemble de ces conditions constitue un problème technique pour la résolution duquel ont été proposées des solutions fragmentaires.

II. — Antériorités

En principe, les taches de départ doivent être formées sur le chromatogramme d'une manière régulière tout le long de la ligne de départ. L'uniformité des taches dépend non seulement du choix des micropipettes, mais également du mode d'utilisation du courant d'air, chaud ou froid, nécessaire pour assurer leur séchage.

L'expérience montre que l'efficacité d'une source de courant d'air disposée à demeure soit à gauche, soit à droite de l'opérateur, varie en fonction de son éloignement des taches, la dernière étant séchée plus lentement et moins parfaitement que les premières. Il est possible de remédier à cet inconvénient en rendant cette source mobile sur une tige métallique disposée au-dessous ou au-dessus du chromatogramme. L'avantage d'une telle amélioration est évident, mais insuffisant en raison de l'impossibilité de sécher simultanément toutes les taches d'une grande feuille de papier.

Certains ouvrages, même les plus récents, concernant la chromatographie sur papier n'apportent que très peu de renseignements codifiés sur les appareils facilitant la pose et le séchage des taches de départ (2), (3), (4), (5), (6).

Boulanger et Biserte (7) insistent seulement sur le séchage des taches en conseillant d'utiliser une étuve ou un ventilateur type « séchoir à cheveux ».

Block, Durrum et Zweig (op. cit. (1) p. 55) préconisent l'emploi d'une plaque de verre et considèrent que les pertes de substances sont minimes dans ce cas puisque le liquide, ayant traversé le papier, est absorbé par l'autre face de la feuille. Le séchage des taches est assuré au moyen d'un séchoir à cheveux ou d'une lampe à rayons infra-rouges.

Pour Linskens (8), le chromatogramme doit être disposé, pendant le dépôt des gouttes et leur séchage, sur le creux d'un dispositif en verre ou en bois sous forme de U.

Tanner (9) décrit un montage plus perfectionné comprenant l'emploi d'une plaque de verre, sur laquelle sont placés deux baguettes de verre parallèles, et d'un séchoir à cheveux. Le chromatogramme est étalé sur cette plaque et les baguettes de verre et maintenu en place par deux plaquettes de verre disposées de part et d'autre des baguettes. La plaquette se trouvant juste devant l'opérateur est inclinée et rendue solidaire de la plaque-support à l'aide de pinces. La ligne de départ sur le chromatogramme doit être au-dessus de l'intervalle qui sépare les deux baguettes de verre.

Comme support, un cadre en bois avec des encoches ou des trous circulaires pour les tiges de verre constitue la meilleure solution signalée dans les ouvrages de Merck (10) et de Magnitzkii, Schougarov et Malkov (11), puisque dans ce cas la ligne de départ se trouve entre deux tiges. Toutefois, Ma-

GNITZKII et ses collaborateurs utilisent un écartement de tiges trop grand. Notons que ces auteurs indiquent en même temps l'emploi d'une plaque de verre comme support pour le chromatogramme ; pour le séchage des taches ils font appel à un ventilateur ou à un appareil de chauffage au-dessus duquel on dispose le chromatogramme. L'utilisation des tubes ou des baguettes de verre doit être considéré comme un progrès par rapport à l'emploi d'une plaque de verre comme support du chromatogramme, même si l'on évite le contact de ce dernier avec le verre par l'intermédiaire des baguettes de verre. Toutefois, le manque de système de fixation permettant de maintenir les chromatogrammes toujours horizontaux, tendus et immobiles, présente un inconvénient sérieux.

En effet, les chromatogrammes laissés libres glissent facilement sur les baguettes ou les tubes de verre. En outre, si l'écartement de ces derniers est grand, le chromatogramme a tendance à se plier légèrement surtout au point de la pose des taches sur la ligne de départ ce qui ne facilite pas le travail régulier. En outre, pour l'écartement normal de l'ordre de 20 mm, il faut constamment vérifier que la ligne de départ est toujours entre deux tubes sans toucher l'un ou l'autre.

Un défaut commun à tous les modes opératoires réside dans l'imperfection du séchage des taches de départ au point de vue de sa rapidité. Il est clair qu'un seul ventilateur, disposé au-dessus ou au-dessous du chromatogramme, ou soit à gauche, soit à droite de l'opérateur, ne peut assurer le séchage régulier et simultané de toutes les taches sur la ligne de départ. L'utilisation de plusieurs ventilateurs serait onéreuse et incommoderait l'opérateur.

Signalons à titre documentaire qu'en 1956 GULICK (12) a proposé un dispositif en verre destiné à faciliter le dépôt de grands volumes du liquide à chromatographier sous forme de petites taches. Leur séchage rapide est réalisé par la circulation de l'air chaud tout près des points d'application, au-dessus et au-dessous du chromatogramme. Le procédé s'applique seulement aux bandes étroites et présente quelques inconvénients au point de vue construction du dispositif.

Il ressort de tout ce qui précéde que jusqu'à ce jour la mise au point d'un appareil chromatographique réunissant toutes les conditions mentionnées tout à l'heure et nécessaires pour réussir un chromatogramme, valable pour les chromatographies ascendante et descendante, constitue un problème à résoudre.

En raison des difficultés rencontrées au cours de nos rechreches comprenant l'emploi de la méthode chromatographique, nous avons entrepris l'étude de différentes solutions possibles de ce problème. Finalement nous avons réussi à mettre au point un appareil simple répondant valablement à toutes les exigences du mode opératoire rationnel concernant la pose et le séchage des taches de départ. Dans ce qui suit nous donnerons sa description complète ainsi que son mode d'emploi.

III. — Recherches personnelles

L'exposé des résultats de nos recherches concernant l'appareil chromatographique facilitant la pose et le séchage des taches ou des bandes de départ comprend trois parties, à savoir : la description de l'appareillage, la comparaison critique de différentes micropipettes et l'étude de l'efficacité du mode opératoire proposé.

A. — Appareil facilitant la pose et le séchage rapides des taches ou des bandes de départ sur les chromatogrammes

a) Principe de l'appareil.

L'appareil chromatographique est un ensemble destiné à assurer la réussite de l'opération de pose des taches de départ sur les chromatogrammes.

Son premier rôle consiste à réduire au minimum le contact du chromatogramme avec les corps étrangers. Cette condition est obtenue par l'étalement de la feuille de papier sur un assemblage de tubes de verre parallèles, distants l'un de l'autre et disposés à une certaine hauteur. Il est facile dans ces conditions de maintenir la propreté du travail d'autant plus que le nettoyage des tubes de verre ne présente aucune difficulté.

Grâce à l'emploi d'un dispositif de fixation, le chromatogramme se trouve tendu d'une façon convenable sans qu'il puisse être détérioré ou déformé ou s'incurver au contact de la micropipette.

En deuxième lieu l'appareil est destiné à rendre la formation des taches de départ très aisée et rapide.

A cet effet, la ligne de départ est disposée sur un canal dans lequel circule un fort courant d'air ; en outre, elle reçoit par dessus de multiples jets d'air distribués par deux rampes parallèles et opposées. L'uniformité d'aération intense permet le séchage presque instantané des taches de départ.

La pose de ces dernières est facilité par l'existence d'un appui-main tout le long du support ce qui permet de bien contrôler la micropipette et la tenir perpendiculairement au chromatogramme.

b) Description de l'appareil.

L'appareil chromatographique comprend quatre parties essentielles :

1. — Un cadre en bois ou en matière plastique dont l'intérieur est garni de baguettes ou de tubes de verre parallèles sur lesquels le ou les chromatogrammes (papyrogrammes) sont disposés ;

2. — deux dispositifs de fixation destinés à maintenir les chromatogrammes en place ;

3. — Un système de distribution d'air, froid ou chaud, à l'aide d'un canal passant sous le chromatogramme et de deux rampes percées de trous et disposées l'une en face de l'autre des deux côtés du canal et au-dessus du papier ;

4. — Une source d'air propulsé froid ou chaud.

La figure 1 assez schématique donne l'aspect général de l'appareil tandis que sa section transversale, faite à l'échelle, est représentée par la figure 2.

La description détaillée de l'appareil est exposée dans ce qui suit.

1. *Cadre à tubes de verre*

Le corps de l'appareil est constitué par un cadre rectangulaire A, B, C, D, en bois ou en matière plastique. Les dimensions du cadre peuvent être variables suivant le nombre ou la grandeur des chromatogrammes.

Les dimensions intérieures du cadre de notre premier appareil prototype,

utilisé pour nos essais, étaient les suivantes : longueur 61,5 cm, largeur 46 cm, hauteur 6 cm, épaisseur des parois 1,5 cm.

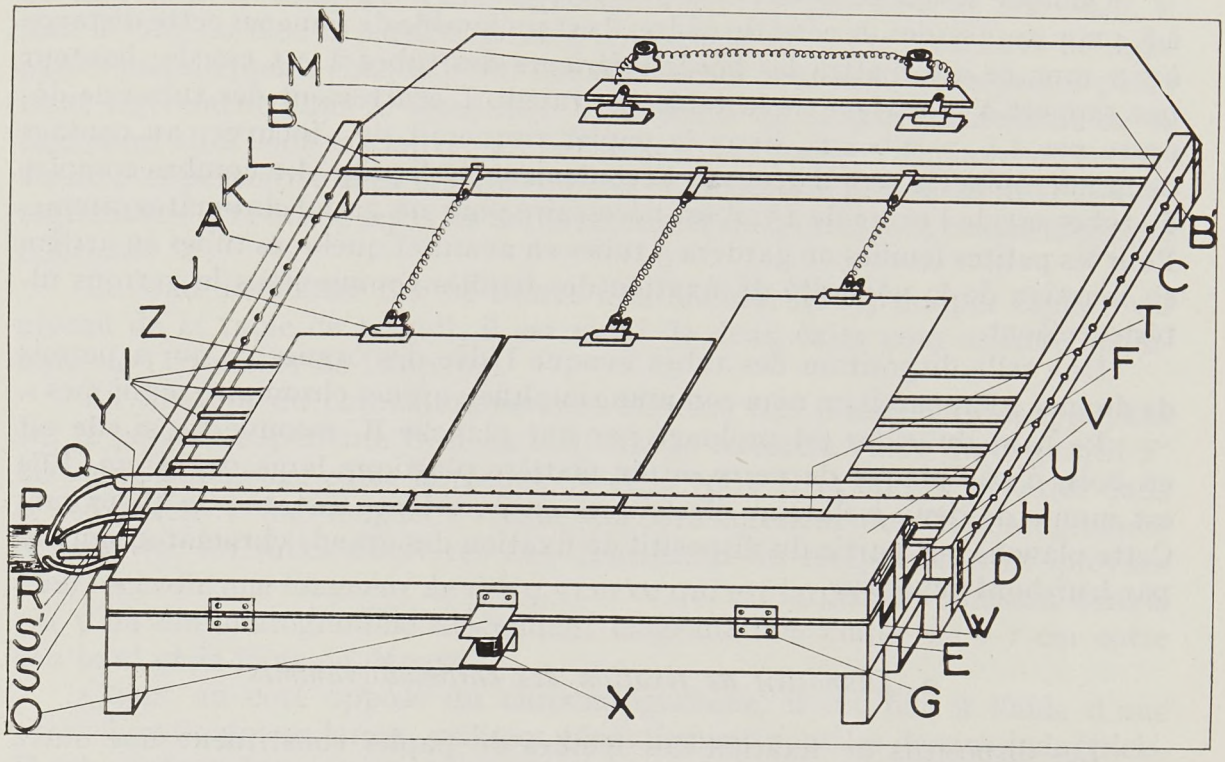


Figure 1.

Le côté gauche et éventuellement le côté droit comportent les ouvertures latérales pour rendre le cadre plus aéré.

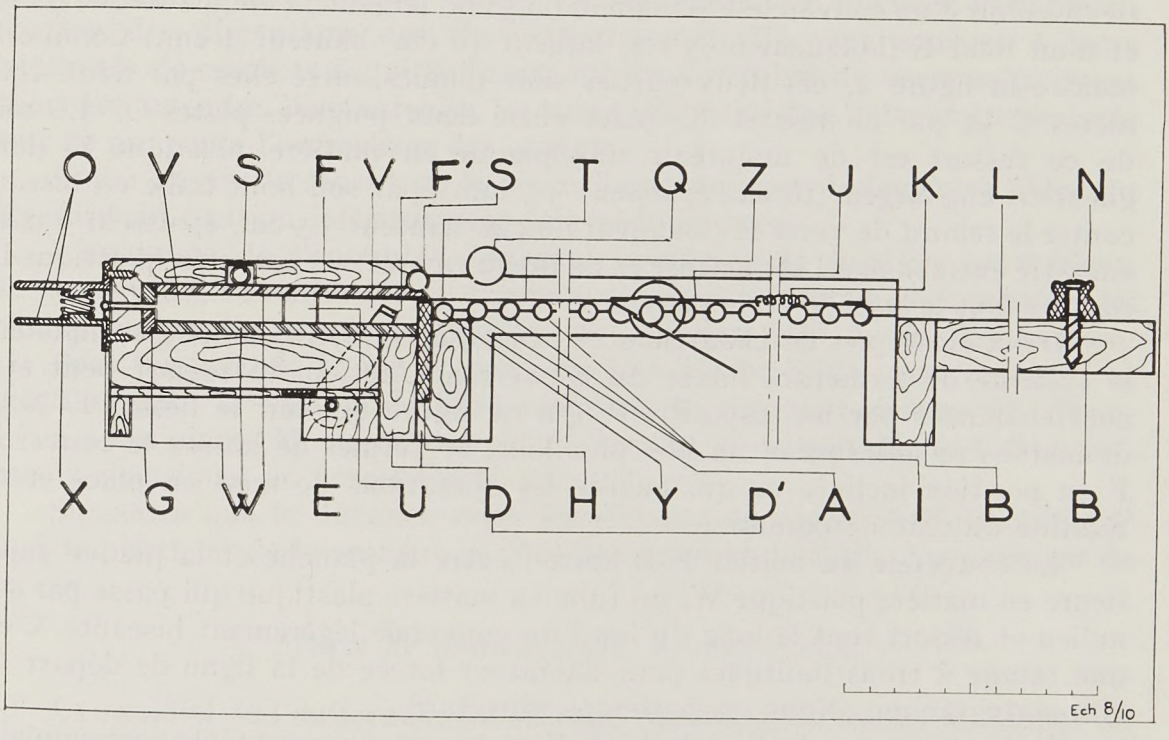


Figure 2.

L'intérieur du cadre est muni de tubes en verre, pleins ou creux, de 10 mm de diamètre placés dans les trous circulaires pratiqués dans l'épais-

seur des parois gauche et droite et maintenus en place par une plaquette apposée sur un de ces côtés.

Quoique les deux dessins du prototype montrent le niveau de ces tubes à 8,4 mm au-dessous de celui du cadre, il est préférable de ramener cette distance à 6,7 mm, ce qui mettra les bords inférieurs des tubes à 4,5 cm de hauteur par rapport à la surface de la table de travail. L'écartement des tubes ne dépasse pas 1,9 — 2,0 cm, sinon le papier risquerait de s'incurver au contact de la micropipette ce qui gênerait l'écoulement du liquide. Le nombre complet de tubes est de l'ordre de 15 ; il est nécessaire pour un grand chromatogramme. Pour les petites feuilles on gardera 5 tubes en avant et quelques tubes en arrière en fonction de la nécessité de fixation des feuilles comme nous le verrons ultérieurement.

Une telle disposition des tubes évoque l'idée des orgues ce qui a permis de donner à l'appareil un nom commun simplifié « orgues chromatographiques ».

Le haut du cadre est prolongé par une planche B_1 recouverte, si elle est en bois, d'une plaque de verre ou de matière plastique large de 15 cm. Elle est munie de deux isolateurs électriques en porcelaine distants de 16-17 cm. Cette planche fait partie du dispositif de fixation des grands chromatogrammes par leur bord supérieur.

2. *Dispositif de fixation des chromatogrammes*

Les dispositifs de fixation des feuilles de papier constituent une autre originalité de l'appareil.

Ils sont conçus pour assurer le maintien des chromatogrammes en place par leurs bords supérieur et inférieur, ce dernier portant la ligne de départ.

Le dispositif inférieur a la forme d'un boîtier et se compose de deux parties à savoir d'un couvercle F (longueur 60,5 cm, largeur 12 cm, hauteur 1,7 cm) et d'un fond E (longueur 60,5 cm, largeur 10 cm, hauteur 4 cm). Comme le montre la figure 2, ces deux parties sont réunies entre elles par deux chanières G et par un ressort X, placé entre deux poignées plates O. Le rôle de ce ressort est de maintenir une plaque en matière plastique W (longueur 60 cm, largeur 10 cm, épaisseur 3,5 mm), par son bout taillé en biseau, contre le rebord de verre H (longueur 60 cm, hauteur 3,5 cm, épaisseur 6 mm) encastré entre la paroi D du cadre et un liteau en bois ou en matiére plastique D' disposé tout le long de cette paroi.

Deux élastiques en caoutchouc U, disposés symétriquement, complètent le système de fermeture forcée du couvercle. L'action du ressort peut être contrebalancée par un dispositif F' qui ne figure que sur le dessin 1. Nous donnerons sa description un peu plus loin. Il permet de laisser le couvercle F en position inclinée ce qui facilite les opérations de mise en place et de fixation du chromatogramme.

Le couvercle du boîtier F E abrite, entre la planche et la plaque supérieure en matière plastique W, un tube en matière plastique qui passe par son milieu et ressort tout le long du bord du couvercle légèrement biseauté. C'est une rampe à trous multiples pour l'aération forcée de la ligne de départ du chromatogramme. Nous en parlerons plus tard.

Entre le couvercle F et le fond E se trouve un receptacle rectangulaire V (longueur 60 cm, largeur 9,5 cm, hauteur 0,9 cm), formé par trois plaques en matière plastique W de 3,5 mm d'épaisseur. Ce receptacle est destiné à recevoir le bord inférieur du chromatogramme descendant ou ascendant.

En outre, ce réceptacle permet le fonctionnement du dispositif F' destiné à neutraliser le ressort X et dont nous avons mentionné l'existence plus haut. Ce dispositif se compose d'une tige métallique montée sous le boîtier E F tout le long du bloc D parallèlement à la longueur du cadre à tubes et de deux pattes métalliques à chaque bout. Les extrémités courbées de ces pattes pénètrent légèrement dans le réceptacle V. Grâce à un simple pivotement de la tige, dont elles sont solidaires, les pattes peuvent soulever légèrement le couvercle F et permettre ainsi la mise en place et la fixation plus facile des chromatogrammes. A l'état de repos les bords recourbés des pattes sont contre la plaque inférieure W.

Le fond du boîtier E F se trouve à la hauteur de 1,7 cm par rapport au niveau de la table de travail; il est muni de deux cales pour assurer l'équilibre de l'ensemble de l'appareil.

La fixation du chromatogramme s'effectue très aisément. En appuyant sur la poignée supérieure O et en bloquant le ressort à l'aide du dispositif F' on ouvre le passage entre la plaque W et le verre H et on fait pénétrer dans le réceptacle V une longueur voulue du bord inférieur du chromatogramme disposé sur les tubes de verre. Les dimensions du réceptacle sont prévues pour recevoir une longueur de 9 à 9,5 cm ce qui est largement suffisant dans le cas d'un chromatogramme descendant exigeant une marge de 6-7 cm entre son bord et la ligne de départ.

Quant au côté opposé du chromatogramme, il est fixé à l'aide d'une pince J ou de pinces larges, utilisées généralement pour les dessins industriels. Il est prudent de recouvrir leurs mâchoires soit par des morceaux de matière plastique en feuilles minces, soit par des pellicules en Rhovinal F (Sté PROLABO) en les plongeant dans la solution à 5 p. 100 dans le dioxane. Les pinces à linge en matière plastique conviennent également. Les pinces métalliques ou en matière plastique sont munies de ressorts K de longueur variable en fonction des dimensions des chromatogrammes. Ils sont pourvus à leurs extrémités de crochets L qui se fixent sur un des tubes de verre se trouvant en arrière du cadre. Bien entendu, les tubes intermédiaires doivent être enlevés pour ne pas gêner l'accrochage des ressorts.

Si par hasard le ressort de la pince J est trop fort, la feuille se libère du dispositif de fixation inférieur sans être endommagée.

L'avantage de l'ensemble des deux systèmes de fixation est évident. Ils permettent de maintenir le chromatogramme suffisamment tendu en lui évitant automatiquement les risques de détérioration ou de déformation.

Pour une grande feuille on conserve tous les tubes de verre du cadre et on utilise pour la fixation du bord supérieur du chromatogramme un dispositif à deux pinces M accrochées par un boudin de fil métallique à deux isolateurs électriques en porcelaine N.

Signalons que la distance entre les niveaux du couvercle F du boîtier F E, d'une part, et de la surface du chromatogramme fixé, d'autre part, est de 2,3 cm.

3. *Source de courant d'air, sa distribution :*

La rapidité et l'uniformité du séchage simultané de toutes les taches ou des bandes déposées sur la ligne du départ d'un chromatogramme dépend de l'efficacité du courant d'air.

L'originalité essentielle de notre appareil chromatographique réside dans la distribution rationnelle d'un jet d'air produit par une soufflerie.

L'expérience a montré que le séchoir à cheveux n'est pas assez puissant pour être utilisé avec succès dans les conditions de notre appareil.

Nous avons fait appel à un vieil aspirateur d'appartement, muni d'un moteur électrique de 1/3 cv (puissance — 230 w), en le transformant en soufflerie. Grâce à l'adjonction d'une résistance électrique il est possible de produire également un courant d'air chaud.

Le courant d'air en provenance de la soufflerie est partagé en quatre conduits sous forme de tubes en matière plastique de 1 cm de diamètre extérieur. Un de ces tubes R dessert le canal Y formé par la plaque de verre verticale et le premier tube en verre faisant corps avec le cadre en bois ou en matière plastique; les dimensions de ce canal sont les suivantes : longueur 60 cm, largeur 1 cm, hauteur 8,5 — 9,0 mm.

Le premier tube de verre repose sur une lanière en matière plastique-mousse maintenue en place par une latte faisant corps avec le bloc D. Dans ces conditions l'étanchéité du fond du canal est parfaite.

Le tube en matière plastique d'amenée d'air R pénètre dans le canal sur une longueur de 2,5 cm.

L'axe de ce canal est marquée soit par les repères sur les bords gauche et droit du cadre de l'appareil ou par un fil noir tendu entre deux pitons placés sur les mêmes bords qui s'enlève après la fixation définitive du chromatogramme. Finalement un fort courant d'air circule sous la ligne de départ du chromatogramme centrée sur l'axe du canal.

Deux conduits S et S' amènent le courant d'air aux deux extrémités du tube en matière plastique S (longueur 60 cm, diamètre extérieur 9 mm) disposé dans le couvercle F tout le long de sa bordure au-dessus de la plaque en matière plastique W. Ce tube S est percé de trous de 1 — 1,5 mm de diamètre (23 trous par 10 cm) dirigeant les jets d'air vers la ligne de départ du chromatogramme.

Enfin, le dernier tube alimente une autre rampe mobile Q sous forme d'un tube en matière plastique de 19 mm de diamètre extérieur et de 64 cm de longueur. Ce tube possède des trous de 1 — 1,5 mm de diamètre à raison de 21 trous par 10 cm. Ces trous dirigent également l'air vers la ligne de départ du chromatogramme.

Cette rampe mobile Q peut être écartée pendant la fixation du chromatogramme. Replacée, elle doit avoir une position fixe ce qui est facile à obtenir par l'emploi de bagues ou boutoirs non représentés sur les dessins.

La distance entre les deux rampes décrites est de 2,2 cm.

La combinaison de deux types de courants d'air distribués par le canal et par les deux rampes à trous multiples détermine un séchage rapide des taches ou des bandes de départ sur le chromatogramme.

B. — Étude de l'utilisation de l'appareil

a) Mode opératoire

Le prototype de l'appareil chromatographique, construit entièrement à l'atelier de notre Station, peut facilement recevoir des feuilles chromatographiques entières du format commercial par exemple, marque Whatman 46 × 57 cm, marque Arches 53 × 56 cm. En ce qui concerne les feuilles de papier Schleicher und Schüll n° 2043, possédant les dimensions 58 × 60

cm, leur étalement exige un élargissement du cadre, ce qui ne présente aucune difficulté, surtout si la largeur de la table de travail est suffisante.

Les manipulations de l'étalement et de la fixation du ou des chromatogrammes sont très simples ; elles s'effectuent dans l'ordre suivant.

La rampe mobile Q étant ramenée à gauche du cadre et le repère de l'axe du canal étant en place, l'ouverture du couvercle F du boitier F E et le blocquage du ressort X à l'aide du dispositif F' permettent l'introduction du bord inférieur du chromatogramme, déjà disposé sur les tubes de verre, dans le réceptacle V à une profondeur compatible avec la destination du chromatogramme (chromatographie ascendante ou descendante). Après avoir centré la ligne de départ du chromatogramme à l'aide du repère de l'axe du canal on débloque le ressort et on ferme le couvercle F. Le chromatogramme se trouve fixé dans sa partie inférieure. La fixation de son bord supérieur s'effectue rapidement à l'aide de pinces à ressorts et à crochets. Ensuite on enlève le repère de l'axe du canal. Si l'étendue du chromatogramme est insuffisante pour couvrir presque complètement toute la longueur du canal, l'utilisation de caches en matière plastique s'impose.

En présence de plusieurs chromatogrammes de petit format il est indispensable de les disposer l'un à côté de l'autre avec les bords latéraux légèrement superposés. Cette manière d'opérer évite la rupture du courant d'air distribué par le canal.

La mise en route de la soufflerie met fin à la première étape des manipulations.

La deuxième étape comprend la pose des taches ou des bandes sur la ligne de départ du chromatogramme. Le succès de cette opération dépend non seulement de la rapidité du séchage des taches, mais également de la qualité des micropipettes. Leur étude comparative fait l'objet du paragraphe suivant.

b) Essais de différentes micropipettes

Si pour les essais qualitatifs l'emploi de simples tubes capillaires effilés, de tubes de verre à bout sphérique et de fils de platine de 2 mm de diamètre est suffisant, par contre, pour les travaux plus ou moins quantitatifs, on s'adresse aux microburettes, aux pipettes hématologiques, aux micropipettes spéciales ou aux tubes capillaires gradués, et enfin aux seringues micrométriques.

Les micropipettes chromatographiques peuvent être divisées en deux groupes : le premier comprend les micropipettes à remplissage automatique par capillarité d'un volume déterminé tandis que dans le deuxième groupe entrent les pipettes à remplissage forcé par aspiration.

Au premier groupe appartiennent des tubes capillaires confectionnés et étalonnés au laboratoire (voir la figure. 3-1) Ces capillaires d'un cm de longueur sont montés dans des tubes-supports de 0,4 cm de diamètre et fixés à l'aide de cire fondue.

Si la fabrication de ces micropipettes est longue et délicate, leur étalonnage l'est également.

On sait qu'elles sont étalonnées par la pesée de 50 prises de la pipette déposée chacune sur un des 50 carrés de papier filtre(1 cm de côté) préalablement tarés ensemble.

Or, un tel étalonnage est sujet aux erreurs dues à l'évaporation de l'eau.

En plus il est difficile d'obtenir pour ces tubes un bord biseauté net ; le lavage et l'entretien de ces tubes capillaires est difficile.

Parmi les micropipettes à remplissage par aspiration nous avons expérimenté les micropipettes suivantes : (voir le figure 3) la pipette hématologique de POTAIN (II) les micropipettes chromatographiques de SHANDON (III) 2060, de PRÉCISS (IV) et de la Société « Verre et Technique » (V). *La pipette*

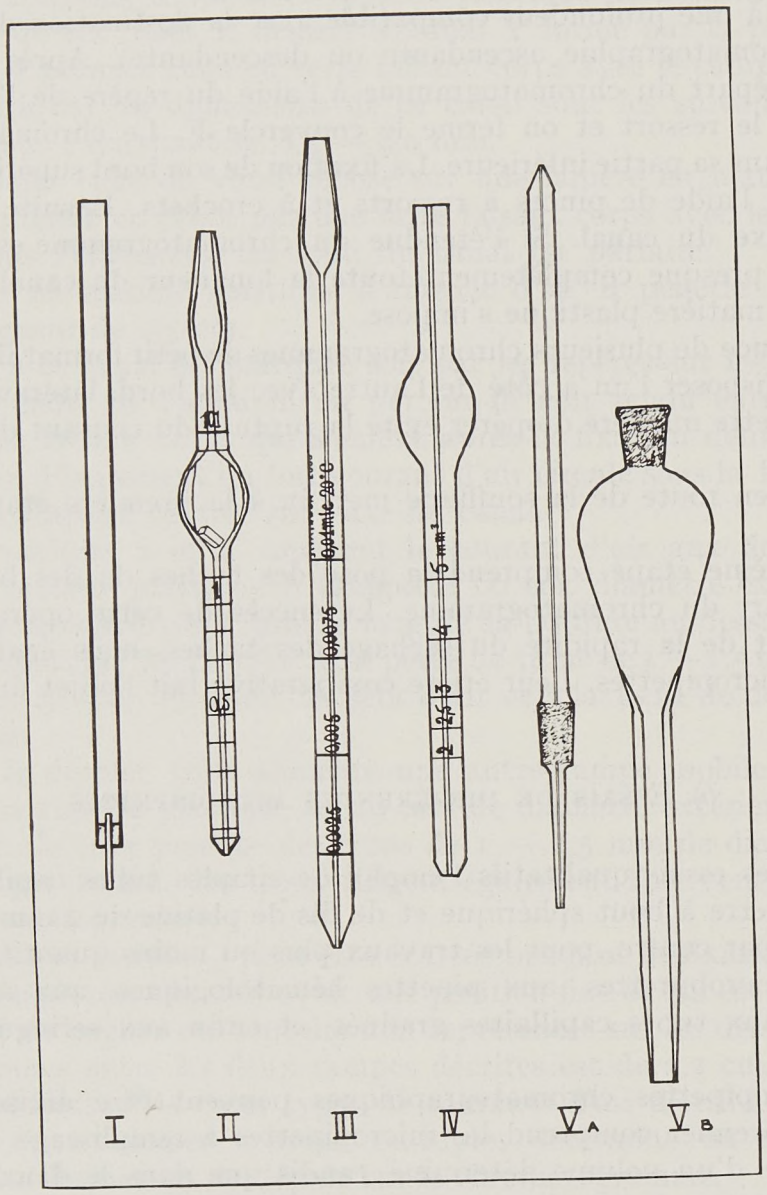


Figure 3.

de POTAIN (II) possède un capillaire gros ; les taches obtenues sont trop larges en raison du diamétre extérieur de l'extrémité inférieure important, de l'ordre de 2 mm.

La micropipette SHANDON (III) possède les caractéristiques suivantes : capacité — 10 microlitres ; graduation — 4 divisions ; longueur — 12 cm, diamètre de la partie cylindrique — 0,5 cm ; diamètre de l'extrémité conique — 1,9 mm.

Parmi ses défauts on notera :

1° Les spots obtenus sont trop larges en raison de l'importance du diamètre de l'extrémité conique.

2° Le diamètre du capillaire (0,46 mm) est trop grand ce qui provoque l'écoulement plus rapide du liquide influançant défavorablement la formation régulière des taches et des bandes de départ ;

3° La capacité réelle de la micropipette est supérieure à 10 microlitres ce qui nécessite l'ajustage de ce volume après le remplissage.

La micropipette HAYEM *de marque* PRÉCISS (IV) de 10 cm de longueur totale a une capacité étalonnée de 5 microlitres avec 5 divisions.

Son capillaire est bon en raison de la faiblesse de son diamètre. Par contre, l'extrémité conique de la pipette est trop grosse et doit être améliorée au moyen d'une meule. L'existence d'une boule et d'un tube au-dessus du capillaire constitue un autre défaut empêchant l'élimination aisée des bulles d'air formées dans le capillaire.

En ce qui concerne les caractéristiques de la *micropipette automatique démontable* (Société « Verre et Technique », (V) de capacité de 10 microlitres, elles sont légèrement variables comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU I

Capacité en microlitres	Longueur totale en cm	Diamètre de la partie supérieure avant le rodage en cm	Diamètre du capillaire en mm
10,11	10,2	5	0,354
10,26	11,65	5	0,334
10,33	9,6	5	0,370

La meilleure pipette correspond à la longueur la plus grande ; sa maniabilité est meilleure et l'écoulement du liquide est régulier à cause du diamètre plus petit du capillaire.

Pour améliorer l'efficacité de ces micropipettes il est indispensable de ramener le diamètre extérieur de l'extrémité de la partie conique de la pipette, se trouvant au-dessous du rodage, de 2 mm à 1 mm à l'aide d'une meule électrique.

Le diamètre d'une telle dimension permet un écoulement facile et régulier du liquide du fait du contact parfait avec le papier. Il permet en outre de tracer des bandes fines et sans bavures.

Parmi les autres avantages de la micropipette mentionnée il faut noter la facilité de son lavage et de son remplissage. En effet, grâce à son rodage conique il est aisé de réunir la partie pipette au réservoir (V_b) muni d'une allonge par laquelle on effectue l'aspiration, l'excès du liquide tombant dans le réservoir.

L'absence de graduation constitue un inconvénient, mais il n'y a aucune difficulté pour le traçage des repères correspondants aux capacités de 5 et de 2,5 microlitres.

Employée sans réservoir et plongée verticalement par sa partie conique dans un liquide la micropipette s'est rempli par capillarité jusqu'au volume de 5 microlitres ; en l'inclinant, on obtient son remplissage presque complet.

Pour assurer l'écoulement plus lent du liquide et la finesse plus grande

des taches ou des bandes il est préférable de remplir la micropipette à moitié de sa capacité.

En effet, l'utilisation de sa capacité complète produit des résultats moins bons.

En outre, à chaque addition du liquide doit correspondre le volume de 2,5 microlitres de sorte que la pipette chargée à 5 microlitres débitera son contenu en deux fois.

D'une façon générale, les pipettes de trop forte capacité, vidées en plusieurs affusions, nécessitent de la part de l'expérimentateur une attention plus soutenue pour éviter un remplissage à contre-temps.

En ce qui concerne les micropipettes de 5 microlitres de capacité de la même marque, elles sont moins faciles à manipuler à cause de leur longueur insuffisante.

Les résultats des essais comparatifs de différentes micropipettes nous permettent de considérer comme la meilleure la *micropipette automatique démontable* (marque « Verre et Technique ») de 10 microlitres de capacité à condition de choisir sa longueur de l'ordre de 11,5 — 12 cm et de rendre son extrémité plus conique pour que le diamètre de la pointe soit égal à 1 mm.

Une telle sélection des micropipettes est indispensable car de leur choix dépend l'efficacité de l'appareillage.

c) Efficacité de l'appareillage

L'efficacité de l'appareillage proposé se juge d'après la finesse des taches et des bandes de départ et d'après la durée de leur pose et de leur séchage.

Voyons d'abord les normes recommandées par différents auteurs pour le diamètre des taches et pour la largeur des bandes.

D'après Boulanger et Biserte (op. cit (7)), la limite dans ces deux cas est de l'ordre de 3 — 4 mm pour les volumes de liquide compris entre 2 et 20 microlitres (cf. op. cit (2)). Toutefois, Hellmann (op. dit. (3)) et Liskens (op. cit. (8)) admettent comme valeur maximale 10 mm pour le diamètre des taches. Or, déjà pour les volumes au-delà de 25-50 microlitres on conseille l'utilisation de dispositifs spéciaux (op. cit. (1)).

C'est ainsi que le dispositif de Gulick (op. cit. (12)) permet d'obtenir des taches de 4 — 5 mm de diamètre pour 100 microlitres de liquide au bout de 10 minutes, le temps dépendant de la température, du papier et de la volatilité du solvant.

Au cours de nos essais concernant l'efficacité de notre appareil au point de vue de la finesse des taches et des bandes de départ et de la vitesse de leur séchage nous avons utilisé toujours le même papier, Arches 302, un courant d'air froid et, comme liquide à chromatographier, un vin rouge.

Afin d'éprouver le comportement de notre appareillage dans les conditions les plus difficiles nous avons commencé par l'étude de la finesse de plusieurs bandes de départ en fonction des volumes grandissants de vin rouge. A cet effet on formait sur une feuille de papier Arches 302, longue de 48 cm, à l'aide d'une micropipette de 10 microlitres, de marque «Verre et Technique », des bandes de 2 cm de longueur séparées par des intervalles de 2 cm. Les premières bandes correspondaient aux volumes de 20, 40, 60, 80 microlitres ; on les répétait sur deux autres longueurs de 16 cm de sorte que finalement sur 12 bandes formées il y avait pour chaque volume de vin utilisé 3 bandes

semblables disposées à des distances variables. Les bandes étaient séchées par un courant d'air froid, la température du laboratoire était de + 20°C.

Suivant notre mode opératoire à chaque affusion correspondait le volume de 2,5 microlitres. Nous considérons que ce volume présente un optimum dans les conditions de notre travail.

D'après BLOCK, DURRUM et ZWEIG (op. cit. (1)) le volume optimal et maximal d'une addition est de 5 microlitres.

Les mesures effectuées ont montré que la largeur de nos bandes n'excédait pas 2,0 — 2,5 mm sauf pour les bandes de 80 microlitres ou certains points atteignaient parfois 3,0 mm.

Un autre essai a été effectué dans les mêmes conditions sauf pour la température de la pièce de travail qui était de + 29°C. La largeur de 8 bandes, correspondant aux volumes échelonnés de 10 à 80 microlitres sur une longueur de 26 cm, était partout de l'ordre de 2,0-2,2 mm.

On remarquera que la finesse des bandes est uniforme et n'excède pas 2,5 mm ce qui constitue une nette amélioration par rapport aux largeurs habituellement préconisées, de 3 — 4 mm.

En ce qui concerne les taches rondes nous avons expérimenté l'influence des volumes croissants d'un vin rouge sur le diamètre moyen des taches.

Les conditions des essais étaient les mêmes que précédemment. On formait 8 taches sur une feuille de papier Arches 302 de 16 cm de longueur, les centres de taches successives étant à 2 cm de distance ; la température du laboratoire n'excédait pas 20°C.

Les taches obtenues de forme très légèrement elliptique avaient des diamètres moyens compris entre 2,1 et 5,25 mm comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU II

Volume de vin en microlitres	Diamètre des taches en mm
2,5	2,1
5,3	2,75
8,7	2,8
12,7	3,15
17,7	3,75
24,3	4,25
30,0	4,6
40,0	5,25

L'aspect des taches et des bandes peut devenir encore plus régulier si l'on fait appel à l'emploi de gabarits en matière plastique, par exemple, pour faciliter le traçage préalable des ronds et des limites supérieures des bandes au moyen d'un crayon ordinaire, comme cela se fait habituellement.

Les résultats des essais effectués permettent de conclure que notre appareil est susceptible de produire des bandes et des taches de départ d'une finesse et d'une régularité excellentes.

Cet avantage est dû à la supériorité de notre système d'aération qui permet d'obtenir un séchage très rapide et uniforme des taches et des bandes au cours de leur formation.

Par l'évaporation accélérée du solvant ces dernières sont fixées sans produire un étalement des subtances.

Nous avons effectué un certain nombre d'essais pour évaluer la vitesse de séchage des bandes correspondant au volume de 40 microlitres à l'aide d'un

courant d'air froid, une pipette étant attribuée à chaque échantillon des vins rouges utilisés.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III

Prise de vin rouge — 40 microlitres pour une bande de 2 cm de longueur.
Température du laboratoire + 29°C
Courant d'air froid

Essai n°	Nombre de micropipettes	Nombre de chromatogrammes	Nombre de bandes sur chaque chromatogramme	Temps en minutes pour	
				l'ensemble des chromatogrammes	chaque bande
1	2	1	2	12	6
	2	1	2	12	6
2	2	2	2	18	4,5
	2	2	2	17,5	4,4
3	3	1	3	12	4
	3	1	3	12	4
	3	1	3	9	3
	3	1	3	11	3,9

Dans l'expérience n° 1 on utilise deux vins et alternativement deux micropipettes, une pour chaque bande. La formation de deux bandes correspondant chacune au volume de 40 microlitres demande 12 minutes, les recharges des micropipettes comprises (8 fois), soit une moyenne de 6 minutes par bande.

Il est souvent nécessaire de disposer de deux exemplaires d'un même chromatogramme. C'est le cas abordé dans l'expérience n° 2. Cette expérience n'est autre chose que l'élaboration simultanée de deux chromatogrammes identiques à celui du n° 1 (deux vins, deux micropipettes). La première bande du premier chromatogramme reçoit la moitié d'une prise de la micropipette (5 microlitres), l'autre moitié étant destinée à la première bande du second chromatogramme. La même opération est effectuée avec le deuxième vin et ainsi de suite.

La formation de 4 bandes demande de l'ordre de 18 minutes, soit une moyenne de 4 minutes pour chaque bande.

L'expérience n° 3 fait appel à 3 vins et 3 micropipettes. Elle montre que la durée moyenne de formation d'une bande peut être ramenée à moins de 4 minutes.

Avec quatre micropipettes (4 vins) on arrive dans les conditions de notre expérimentation à une limite voisine de 3 minutes et demie pour chaque bande formée.

En admettant que le chromatogramme de 58 cm de long soit susceptible de contenir 12 bandes de 2 cm de longueur, séparées entre elles par la distance de 3 cm, il faudrait 45 minutes environ pour la formation de bandes de 40 microlitres chacune, même si l'on utilisait 12 micropipettes. Or, le coût d'un tel nombre de pipettes serait excessif. En outre, il faudrait dans ce cas disposer d'un support spécial permettant d'éviter les erreurs pendant les manipulations avec les pipettes et de faciliter le travail en série.

Dans ces conditions nous pensons que l'emploi de quatre pipettes est suffisant puisqu'au-delà il n'est pas possible d'augmenter la rapidité du tra-

vail. Ce nombre permet de former quatre bandes à la fois de sorte que pour 12 bandes trois séries de manipulations deviennent nécessaires. Signalons que l'emploi d'un boulier à plusieurs étages est très commode pour marquer le nombre de remplissages successifs de chaque micropipette.

Sans aucun doute, le courant d'air chaud est susceptible de provoquer une évaporation du solvant plus rapide par rapport à celui d'air froid utilisé par nous ; par contre, il provoque, souvent les modifications des substances à chromatographier.

Nous avons cherché également à comparer l'efficacité de notre appareil, avec celui d'un séchoir à cheveux disposé à gauche de l'opérateur. A une distance de 8 cm de ce séchoir les bandes de 20 microlitres sont acceptables au point de vue de leur largeur (2,5 — 3 mm), à la distance de 17 cm elles sont plus larges, plus irrégulières. Pour des volumes de 40 microlitres les bandes sont trop larges et plus irrégulières surtout si l'on cherche à travailler rapidement. Par contre, en allant doucement le temps nécessaire pour le séchage est de deux fois supérieur par rapport à notre mode opératoire.

En définitive, notre appareil présente des avantages considérables au point de vue de la finesse des taches et des bandes et de la rapidité de leur séchage.

En outre, l'agencement de l'appareil est très simple, sa réalisation n'exige pas des dépenses élevées et peut être effectuée dans les ateliers les plus modestes.

IV. — Conclusions

En conclusion nous insisterons tout particulièrement sur le caractère original de l'appareil et sur sa polyvalence. Cette dernière présente un grand intérêt pratique puisque le même ensemble sert pour assurer non seulement la pose facile des taches et des bandes de départ, mais également leur séchage rapide et uniforme sans qu'une distinction soit faite entre les chromatogrammes ascendants et descendants.

L'originalité de l'appareil se résume en trois particularités essentielles, à savoir :

1. — Son rôle comme support inerte des chromatogrammes de tout format grâce à l'assemblage approprié des tubes de verre d'où la possibilité de garantir la propreté du travail ;

2. — La commodité et la sûreté de ses dispositifs de fixation des chromatogrammes ;

3. — L'agencement rationnel de son dispositif de ventilation.

En plus, d'autres avantages pratiques de l'appareil résident dans sa simplicité, dans la possibilité de sa réalisation aisée dans un laboratoire modeste. Il ne faut pas oublier l'aspect économique de son utilisation. En effet, grâce à l'efficacité de son système de séchage l'emploi simultané de quatre micropipettes constitue un maximum, ce qui limite les causes d'erreur et les frais d'achat de pipettes.

Dans l'ensemble l'appareil donne entière satisfaction au point de vue de sa maniabilité et du rendement. Les résultats de différents tests effectués démontrent l'efficacité du mode opératoire établi, permettant un travail en série. Dans ces conditions le problème de standardisation et d'amélioration des opérations chromatographiques telles que la pose et le séchage des taches ou des bandes de départ sur les chromatogrammes peut être considéré comme résolu dans sa grande partie.

Résumé

La pose et le séchage rapide et simultané des taches ou des bandes de départ sur les chromatogrammes de dimensions variables constitue un problème important, peu étudié surtout au point de vue de la technique d'exécution. Or, le manque de dispositifs destinés à rendre plus efficaces ces opérations, prises dans leur ensemble, est préjudiciable à la réussite du travail en série.

Les recherches effectuées ont permis de mettre au point un appareil original très simple, facilement réalisable dans un laboratoire d'analyses.

Sa description détaillée, l'exposé des résultats des études de micropipettes et de l'efficacité du mode opératoire établis constituent le sujet du mémoire.

L'appareil est appelé à rendre de bons services dans un grand nombre d'activités faisant appel à la chromatographie de partage sur papier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Block (R.), Durrum (E.), Zweig (G.). — A Manuel of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2 éd., 55, 1958. —

(2) Lederer (E.), Lederer (M.). — Chromatography. A Review of principles and application — 1953, Amsterdam, Elsevier Publishing, C° éd.

(3) Grüne (A.). — Chromatographie sur papier — Méthode de travail, 1956, Dassel, Carl Schleicher und Schüll Verlag.

(4) Hellmann (H.). — Papierchromatographie, dans Paech (K.) Tracey (M.). — *Moderne methoden der Pflanzenanalyse*, **1**, 127, 1956, Berlin Göttingen-Heidelberg, Springer Verlag.

(5) Grüne (A.). — Papierchromatographie und Papierelektrophorese *Chimia*, **2**, 173, 213, 1957.

(6) Cramer (F.). — Papierchromatographie, 1958, Weinheim, Bergstr. Verlag Chemie.

(7) Boulanger (H.), Biserte (G.). — Chromatographie de partage sur papier dans Lederer (E.). — *Chromatographie en Chimie organique et biologique*, **1**, 177, 1959, Paris, Masson éd.

(8) Linskens (H.). — Papierchromatographie in der Botanik, 36, 1959 ; 2eme éd. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer-Verlag.

(9) Tanner (H.). — Die papierchromatographie, eine neue Analysenmethode im Dienst des Analytikers, *Schw. Techn. Zeitsch.*, n° 37, 38, 1957.

(10) Merck (E.). — Chromatographie unter besonderer Berücksichtigungder Papierchromatographie, 34, Merck (E) A. G. Darmstadt-Verlag (paru en 1959 sans l'indication de l'année).

(11) Magnitzkii (K), Schougarov (U), Malkov (V). — Nouvelles méthodes d'analyse des plantes et des sols (titre traduit) 130, 1959, Moscou, Sel'khozguiz éd.

(12) Van Gulick (W). — Application of large volumes in small spots on paper chromatogram strips — *Nature* G.B., *178*, 994, 1956.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1960

KUZDZAL-SAVOIE (S.) et MOCQUOT (G.). — Observations sur les qualités organoleptiques du lait 5
HUGLIN (P.) et SCHWARTZ (J.). — Essai d'obtention et de dégustation de jus de raisin à partir d'hybrides-producteurs..... 53
GUIMBERTEAU (G.). — Application de l'anthrone au dosage des sucres fermentescibles du vin..... 67
GIRARD (H.) et LEDUC (Mme E.). — A propos du test d'assimilation des sucres par les levures..... 79
SAINCLIVIER (M.). — Relation entre la durée de conservation du lait et la teneur en calcium ionisé de l'ultrafiltrat 81
LAFON (J.), COUILLAUD (P.), LAUMEUIL (M.) et MARCHE (M.). — Teneur en plomb des eaux-de-vie de Cognac 109
POISSON (Mme J.). — Conservation du grain en silos étanches. Introduction et étude historique 117
DUPUY (P.). — Le métabolisme de l'acide tartrique..... 139
JAULMES (P.), HAMELLE (Mlle G.) et ROQUES (Mme J.). — Le plomb dans les moûts et les vins 189
NÈGRE (E.), DUGAL (A.) et EVESQUE (J. M.). — La prévision de l'acidité fixe des vins est-elle possible? 247
PUISSANT (A.). — Étude sur la variation de la teneur en NH_4, K, Ca, Mg de quelques raisins au cours de la maturation 321
BARRE (P.) et GALZY (P.). — Étude d'une nouvelle bactérie malolactique 331
BARRE (P.) et GALZY (P.). — Étude et détermination d'une levure osmophile 345
CORDONNIER (R.) et BIZEAU (Cl.). — Séparation par chromatographie d'échange d'ions et dosage des acides lactique, succinique et malique du vin..... 349
BOURDET (A.) et HÉRARD (J.). — Association des protéines et de différentes formes du phosphore dans le gluten 363
JACQUIN (P.). — Dosage de l'acide sorbique dans les boissons..... 393
DEIBNER (L.) et BOURZEIX (M.). — Appareil permettant la pose facile et le séchage rapide et simultané de plusieurs taches ou bandes de départ sur les chromatogrammes 409

CHRONIQUE DES LIVRES

RIBEREAU-GAYON (P.). — Recherches sur les anthocyannes des végétaux, applications au genre *Vitis* 185
ADVENIER. — Contribution à l'étude des relations entre la composition et la valeur boulangère des farines de blé..... 186

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 19-5-1961.

Dépôt légal : 2er trimestre 1961 *N° d'impression : 673*